

DIE pH-ABHÄNGIGKEIT DER LÖSLICHKEIT DER PHOSPHOPYRUVATHYDRATASE (ENOLASE) DES KANINCHENMUSKELS

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philippsuniversität
zu Marburg

vorgelegt von Friedhelm Sauer
aus Essen

MARBURG 1965-

1967

DIE pH-ABHÄNGIGKEIT DER LÖSLICHKEIT DER PHOSPHOPYRUVAT-
HYDRATASE [ENOLASE] DES KANINCHENMUSKELS

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Philippsuniversität zu Marburg

vorgelegt von
Friedhelm Sauer aus Essen

MARBURG 1965



Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Philipps-Universität Marburg/Lahn als

Dissertation angenommen am 14. 12. 1967

Tag der mündlichen Prüfung am 20. 12. 1967

Berichterstatter Prof. Dr. C. Dimroth

Mitberichterstatter Prof. Dr. Dr. Th. Bücher

Inhaltsverzeichnis

Einführung	3
<u>Ergebnisse</u>	
Enolase	5
Isolierung und Kristallisation	7
Fremdaktivitäten	14
Stabilität des Proteins	15
Kinetik der Einstellung der Lösungsgleichgewichte	15
pH-Abhängigkeit der Löslichkeit	16
Fällungsformen	20
pH-Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität	26
Spezifische Pufferkapazität	26
Optische Aktivität	26
Viskosität	26
Myoglobin	30
Löslichkeit des CO-Myoglobins	32
Löslichkeit des Metmyoglobins	32
Löslichkeit des Cyanmetmyoglobins	32
Fruktose- 1,6 -diphosphataldolase	39
Pyruvatkinase	41
Triosephosphatisomerase	42
Phosphoglyceratkinase	47
Lactatdehydrogenase	47
Glycerin - 3 - aldehydphosphatdehydrogenase	50
Malatdehydrogenase	55
<u>Diskussion</u>	57
Vereinfachende Annahmen	57
Säure-Basengleichgewichte	60
Anwendung der Theorie auf die Enolase	65
Die Theorie der Aussalzung von Debye und Aulay	69
Phasenregel und Löslichkeit der Enolase	75
a Unterschiede im Kristallbild	75

b Unterschiede in den Löslichkeitskonstanten	75
Isoelektrischer Punkt und Proteinlöslichkeit	76
Formänderungen und Löslichkeit der Enolase	77
Zusammenfassung der Diskussion	77
 Der pH-Gang der Löslichkeit als Reinheitskriterium	 81
 <u>Material und Methoden</u>	 83
Die Messung der Löslichkeitskurven	84
Molekulargewichtsbestimmung	88
Messung der optischen Aktivität	88
Messung der Viskosität	89
 <u>Zusammenfassung</u>	 90
Literaturverzeichnis	91

INFÜHRUNG

Die Ausfällung nativer Proteine aus ihrer wässrigen Lösung durch Verändern der Neutralsalzkonzentration - das Aussalzen - ist eine bewährte Methode zur Isolierung und zur Kristallisation von Proteinen. Von F. Hofmeister (1890, 1892) durchgearbeitet und zur Kristallisation des ersten Proteins angewandt, erlaubte sie beispielsweise im Arbeitskreis von Bücher die Kristallisation fast aller Lykolyseenzyme aus wässrigen Extrakten des Kaninchenmuskels in einem Arbeitsgang (1, 2).

Der Gang der Löslichkeit eines Proteins mit steigender Neutralsalzkonzentration lässt sich, wie E.J. Cohn gezeigt hat, im sogenannten Aussalzbereich mit einer einfachen Gleichung beschreiben:

$$\ln S = B - K \cdot c$$

mit c = Salzkonzentration
S = Proteinlöslichkeit
B = Interceptkonstante
K = salting-out-Konstante [1]

Merkwürdigerweise ist die Cohn'sche Formel analog zu jener Beziehung, welche die Neutralsalzwirkung auf die Löslichkeit von Nichtelektrolyten beschreibt. Sie wurde zum ersten Mal von Setschenow (3) für das Aussalzen von Gasen beschrieben und beschreibt auch das Löslichkeitsverhalten von Zucker (4) und Alkoholen (5). Eine thermodynamische Begründung dieser Formel verdanken wir Debye und Mc Aulay (6).

Früh wurde auch erkannt, daß die Löslichkeit der Proteine nicht nur von der Konzentration des Neutralsalzes sondern auch von der Konzentration der Wasserstoffionen in der Lösung abhängt(7). Bereits Distèche (8) hat es unternommen, im Bereich der löslichen Muskelproteine den optimalen pH-Wert für die Fällung einzelner Proteine für die Aussalzung zu finden.

Die genauere Analyse des Fällungsverhaltens ihrer erstmals kristallisierten Enzyme begannen Czok und Bücher mit der Messung des pH-abhängigen Ganges der Löslichkeit eines hochgereinigten Enzympräparats der Enolase (Phosphopyruvathydratase, Nr. 4. 2. 1. 11 des Int. Enzymkatalogs). Sie fanden eine Löslichkeitskurve, die wesentlich von den bis dahin beschriebenen Löslichkeitskurven des CO-Hämoglobins vom Pferd (7) des Eieralbumins und des β -Laktoglobulins abwich: Die Löslichkeit der Enolase weist ein steiles Maximum auf (Typ b in Abbildung 1).

Hier setzt die vorliegende Arbeit ein. Ihr Endziel war ein qualitatives Verständnis des Löslichkeitsverhaltens der Enolase im Aussalzbereich

in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration in der Lösung. Es bestand Hoffnung, in ihr ein Modell in die Hand zu bekommen, das für das Löslichkeitsverhalten eines größeren Kreises von Proteinen stehen konnte. Die enzymatische Eigenschaft war dabei nur in so weit von Interesse, als eine genaue, empfindliche und selektive Bestimmungsmethode im enzymatischen Test zur Verfügung stand.

Um den gesetzten Ziel näher zu kommen, wurde der Befund zunächst durch Messung des pH-Ganges der Löslichkeit der Enolase bei verschiedenen Ionenstärken erweitert und gesichert. Dann war zu prüfen, ob das Löslichkeitsverhalten der Enolase Ausdruck einer weiter verbreiteten Proteineigenschaft ist. Es wurde dazu mit dem Löslichkeitgang von acht anderen Proteinen aus verschiedenen Quellen verglichen.

Schließlich mussten Hypothesen über die Ursachen der Abhängigkeit der Proteinlöslichkeit von der Wasserstoffionenkonzentration herangezogen oder entwickelt werden, die Voraussagen über andere physikalische oder chemische Eigenschaften des betrachteten Proteins erlaubten. Diese Voraussetzungen waren dann zu prüfen.

Die sehr spärliche Literatur über die Theorie der pH-Abhängigkeit der Proteinlöslichkeit war zu sichten, in wie weit sie die Basis enthielt für eine Betrachtung der Löslichkeit im Spezialfall der Enolase.

Enge verknüpft mit der pH-Abhängigkeit der Proteinlöslichkeit ist die Löslichkeitsbeeinflussung durch Neutralsalzwirkung. Auch diese war daher zu messen und ihre Theorie zu verfolgen.

Neben der Bedeutung des Verständnisses der Proteinlöslichkeit für die Einsicht in die Wechselwirkungen zwischen Protein und Lösungsmittel wird das Interesse an der Kenntnis des pH-Ganges der Löslichkeit möglichst vieler Proteine auch aus einem für die Praxis wichtigen Grunde gespeist: Sie erlaubt die überlegte Wahl des pH-Wertes bei Fällungsschritten zur Auftrennung eines Proteingemisches.

Ergebnisse.

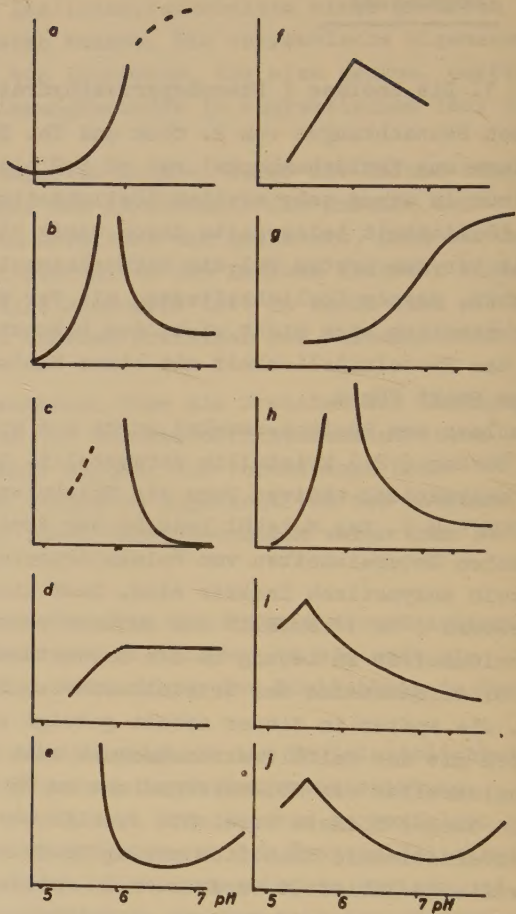
1. Die Enolase (Phosphopyruvathydratase)

Nach Beobachtungen von R. Czok und Th. Bücher zeigt die Enolase aus Kaninchenmuskel bei pH 5,9 ein Löslichkeitsmaximum in einem sehr steilen Löslichkeitsgipfel, während die Löslichkeit beiderseits davon wenig pH-abhängig ist. Damit war zum ersten Mal die Aufmerksamkeit auf ein Protein gelenkt, dessen Löslichkeitgang mit der Wasserstoffionenkonzentration sich nicht den bekannten Vorstellungen von der Proteinlöslichkeit mit einem Minimum im isoelektrischen Punkt fügte.

Enolase aus Kaninchenmuskel wurde zum ersten Mal von Czok und Bücher (2) kristallin dargestellt. Das Protein hat in der enzymatisch aktiven Form ein Molekulargewicht von 82 000 (9). Das Molekül besteht aus zwei wahrscheinlich gleichen Untereinheiten vom Molekulargewicht 41 000, die einzeln enzymatisch inaktiv sind. Nach Winstead und Mitarbeitern (10) zerfällt die Enolase oberhalb zwei molar Ammoniumsulfat in Lösung in die Untereinheiten, die auch die Gitterbausteine des kristallisierten Proteins sein sollen. Wie später in dieser Arbeit gezeigt wird, ergibt sich jedoch mit der Gelfiltrationstechnik auch in 2,2 molar Ammoniumsulfat ein Molekulargewicht um 85 000.

Die bisher höchste erreichte spezifische Aktivität beträgt 86 internationale Einheiten pro mg Protein (11). Diese spezifische Aktivität wurde auch in vorliegender Arbeit erreicht. Das Protein wandert einheitlich in der Agargel- und in der disk-Elektrophorese, wenn man eine Fraktion von etwa 6 % als Fremdprotein betrachtet.

Abbildung 1



Übersicht über die pH-Abhängigkeit der Löslichkeit der in d. Arbeit beschriebenen Proteine.

In der Ordinate die Löslichkeit, in der Abscisse der pH-Wert. Zu den Buchstaben gehören folgende Proteine:

a Trioseisomerase, b Enolase, c Glyceraldehydphosphatdehydrogenase, d Malatdehydrogenase, e Metmyoglobin, f Laktatdehydrogenase, g Aldolase, h Pyruvatkinase, i Cyanmetmyoglobin, j CO-Myoglobin.

REINIGUNG UND KRISTALLISATION DER ENOLASE.

1. Gewinnung des Rohextrakts.

Ein Kaninchen (Deutscher Widder, Alter zwischen ein und zwei Jahren) wurde durch Genickschlag und sorgfältiges Entbluten geschlachtet und die Skelettmuskulatur im Fleischwolf zerkleinert. Die Metallteile des Fleischwols waren gegen Eisenabrieb mit Sprühteflon teflonisiert. (Deutsche Gummi- und Asbestgesellschaft, Büberich bei Düsseldorf)

Alle weiteren Arbeiten wurden bei + 1 Grad C durchgeführt. Es wurde mit dem fünffachen Volumen eines Extraktionsmediums aus 2 molar Ammoniumsulfat und 1 mg Äthylendiamintetraacetat / ml und pH 6,0 unter Rühren extrahiert, bis die Gewebeteile farblos erschienen (drei Stunden) .

Die Extraktionsbedingungen sind unkritisch: Im pH-Bereich von 5,5 bis 7,6 und im Ionenstärkebereich von 0 bis 6 wurde in Probeextraktionen stets pro Muskelgewicht die gleiche Menge Enolase extrahiert, nur die Beimengung von Fremdprotein sinkt mit steigender Ionenstärke ab. Der Zusatz von Äthylendiamintetraacetat ist nicht erforderlich. Eine Nachextraktion bringt überwiegend Fremdprotein in Lösung.

Der hellrot gefärbte Extrakt wurde durch Zentrifugieren (30 Minuten bei 3000 g) oder Filtrieren (einmal über Nylogewebe mit einer Maschenweite von 300 μ , dann zweimal mit einer Maschenweite von 80 μ) von den Gewebsresten abgetrennt. Aus 868 g Muskel wurden so 4,0 Liter Extrakt mit 392 Enolase / g Muskel gewonnen.

4,0 Liter Gesamtvolumen

7,1 mg Protein / ml

85 Einheiten Enolase / ml

340 000 Einheiten Enolase gesamt

spezifische Aktivität 11,1 Einheiten / mg Protein.

2. Der erste Fällungsschritt.

Anschließend wurde durch mechanisches Einstreuen von festem Ammoniumsulfat (Qualität "für biochemische Zwecke") die Ausfällung eingeleitet.

Die Zugabe betrug 20 g / Stunde.

In Probezentrifugationen wurde die spezifische Aktivität der ausfallenden Niederschläge gemessen und alle Fraktionen wurden zur Weiterverarbeitung gesammelt, deren spezifische Aktivität über 20 Einheiten / mg Protein lag. Diese Fraktionen fielen in der Spanne von 2,65 bis 3,22 molar Ammoniumsulfat aus.

Abzentrifugiert wurde 60 Minuten bei 3000 g oder - falls Laktatdehydrogenase in Form feinsten Nadeln ausgefallen war - 60 Minuten bei 16 000 g.

Vor dem Abzentrifugieren der Niederschläge wurde die Zugabe von Ammoniumsulfat für 12 Stunden unterbrochen.

Die Löslichkeit der Enolase ist stark von der Proteinkonzentration im Überstand abhängig und im pH-Bereich um 6 auch sehr stark vom pH-Wert der Lösung. Deshalb kann hier die Angabe der kritischen Ammoniumsulfatkonzentrationen nur als Anhaltspunkt gelten.

Die erhaltene Enolaserohfraktion wurde in 1 molar Ammoniumsulfat vom pH 6,0 gelöst zu einer Lösung von höchster Proteinkonzentration.

282 ml Gesamtvolumen

37 mg Protein / ml

188 000 Einheiten Enolase gesamt, Ausbeute 55 %

10,5 g Protein gesamt

17,9 Einheiten Enolase / mg Protein.

3. Die Gelfiltration.

Nun wurde eine Gelfiltration mit Dextrangel Sephadex G 200 angeschlossen. Dazu wurde eine Säule von 95 cm Länge und 7,0 cm Durchmesser (Gelbettvolumen 3,7 Liter) mit 2 molar Ammoniumsulfatlösung vom pH 6,0 äquilibriert, das Protein in 1 molar Ammoniumsulfat eingesetzt und mit destilliertem Wasser eluiert. Wanderungsgeschwindigkeit des Elutionsmediums 3 cm / Stunde.

Die zu Anfang und zu Ende eluierten 10 % der Aktivität wurden verworfen, die Hauptfraktion in den zweiten Fällungsschritt eingesetzt.

(Diese Gelfiltration ist nicht erforderlich. Sie führt zu keiner wesentlichen Steigerung der spezifischen Aktivität, doch scheint die anschließende Kristallisation leichter zu gelingen und dann zu höherer spezifischer Aktivität zu führen.)

,20 Liter Gesamtvolumen

,27 mg Protein / ml

,35 g Protein gesamt

51 000 Einheiten Enolase gesamt, Ausbeute 44 %

0,5 Einheiten Enolase / mg Protein.

. Der zweite Fällungsschritt.

In diesem Schritt gelingt die Kristallisation. Die geringe Proteinkonzentration, die im Gelfiltrationsschritt erreicht wurde, scheint die Kristallisation und Abscheidung eines Kristallisates höherer spezifischer Aktivität zu fördern.

Der pH-Wert wurde auf pH 5,4 bis 5,6 gestellt und diesmal durch Einpumpen von gesättigter Ammoniumsulfatlösung vom pH 5,3 die Ionenstärke erhöht. Oberhalb einer Ammoniumsulfatmolarität von 2,6 wurde die Zugabe so verlangsamt, daß die Molarität um etwa 0,1 in 24 Stunden zunahm. Bei einer Molarität von 2,81 begann eine Eintrübung, die in kristallisierte Enolase überging. Die Salzzugabe wurde gestoppt und das Sediment wurde nach drei Tagen bei 16000 g in 50 Minuten abzentrifugiert. Es wurde aufgenommen in 3 molar Ammoniumsulfat vom pH 6,0.

10 ml Gesamtvolumen

9,5 mg Protein / ml

220 Einheiten Enolase / ml

34 000 Einheiten Enolase gesamt, Ausbeute 39 %

62 Einheiten Enolase / mg Protein.

5. Umkristallisationen.

Das Präparat kann durch Umkristallisation bei pH 5,3 bis 5,6 weiter gereinigt werden. Dazu wurde es mit Wasser vorsichtig gelöst, bis einige Stunden nach der letzten Wasserzugabe noch eine Resttrübe übrig war. Sie wurde abzentrifugiert und verworfen. Dann wurde erneut Ammoniumsulfat zugesetzt wie in Abschnitt 4.

In einer Teilfraktion wurden als höchste spezifische Aktivität 85 Einheiten / mg Protein erreicht.

Umkristallisation bei pH 5,3 bis 5,6 führt zu einem sehr feinen, nicht eindeutig als kristallin ansprechbaren Niederschlag.

Bei pH-Werten um 6,5 erhält man dagegen schöne Kristallnadeln, die mit der Zeit zu schmalen Platten heranwachsen [Abbildung 9]. Diese Umkristallisation bei pH 6,5 ist jedoch ein weniger wirksamer Reinigungsschritt. Mit ihm sollte man die Präparation abschließen.

Reinigung über Ionenaustauschchromatografie.

An beliebiger Stelle im Trennungsgang kann ein Chromatographieschritt eingeschaltet werden. Er erlaubt eine restlose Abtrennung einzelner Fremdaktivitäten wie von Pyruvatkinase, Glyceraldehydphosphatdehydrogenase und Trioseisomerase. Andere Enzyme wie Lactatdehydrogenase bleiben dagegen bei der Chromatografie stets mit der Enolase vergesellschaftet.

Anionen- und Kationenaustauscher sind ähnlich geeignet, nur daß die einzelnen Fraktionen in umgekehrter Reihenfolge eluiert werden.

Eine Auftrennung kann auf folgende Art erzielt werden:

Der Austauscher DEAE-Sephadex (Firma Pharmacia, Uppsala, Schweden) wird mit Äthylendiamintetraacetat von pH 7,6 0,1 molar äquilibriert, erschöpfend mit destilliertem Wasser ausgewaschen und in die Säule gefüllt. Das Länge/Querschnittverhältnis der Säule war 300. Das Protein wurde gegen Äthylendiamintetraacetat 5 millimolar von pH 7,6 dialysiert und in möglichst hoher Konzentration (etwa 50 mg / ml) eingesetzt. Das Probevolumen war 1 bis 2 % des Gelbettvolumens. Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten mit quartzdestilliertem Wasser in der Mischkammer und Äthylendiamintetraacetatpuffer 100 millimolar vom pH 6,16 in der zweiten Kammer. Das Kammervolumen war 4 mal größer als das Austauschervolumen.

Die Abbildungen 2 und 3 zeigen zwei typische Elutionsdiagramme mit DEAE-Sephadex und CM-Sephadex.

J. A. Winstead und F. Wold (12) haben eine Präparationsvorschrift beschrieben, die einen Hitzeschritt und eine Acetonfraktionierung enthält. Die maximale spezifische Aktivität (86 Einheiten / mg und die Ausbeute (13 %) gleicht den hier erhaltenen Werten.

Enolase, Schema der Kristallisation

Zeichenerklärung

AS = Ammoniumsulfatmolarität

E/mg = Internat. Einheiten Enolase/mg Protein

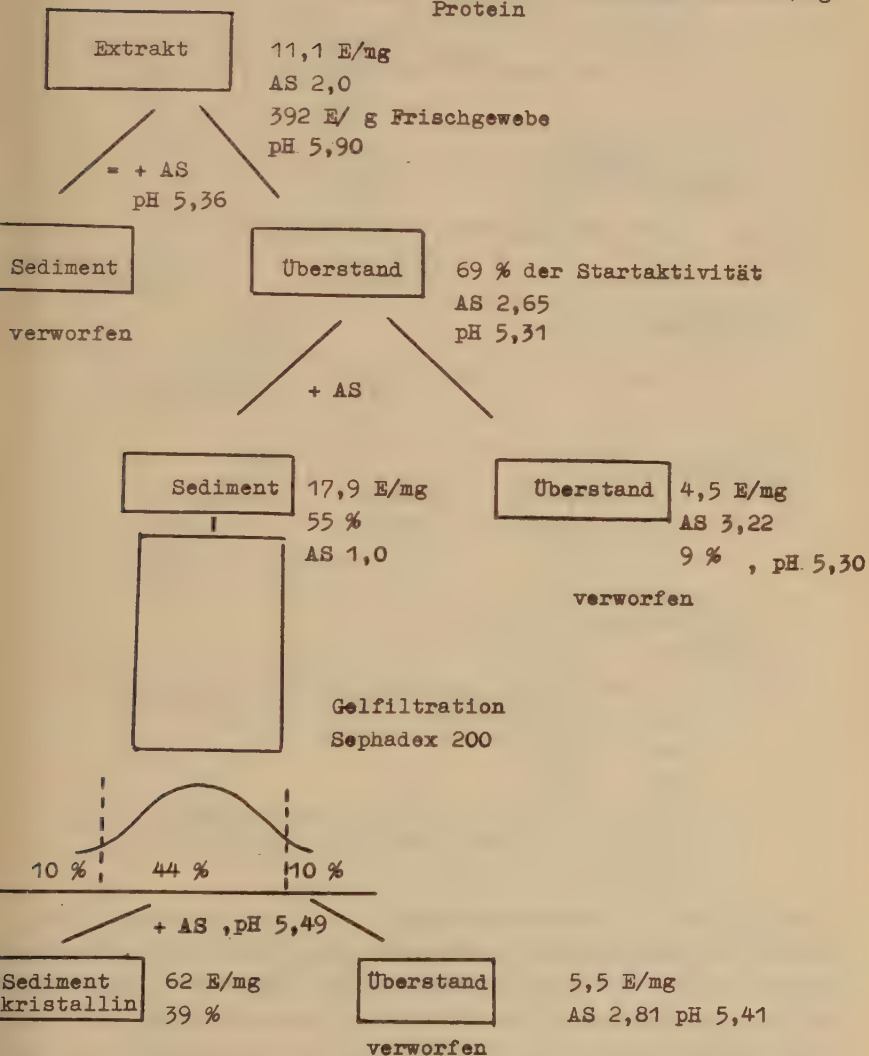
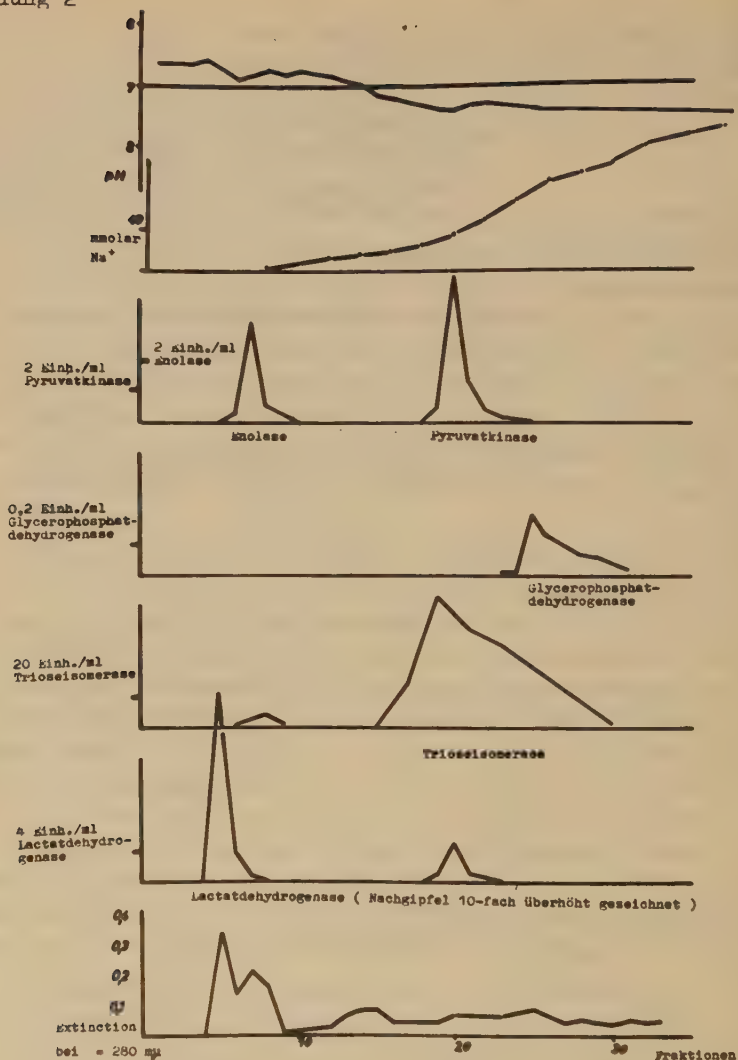
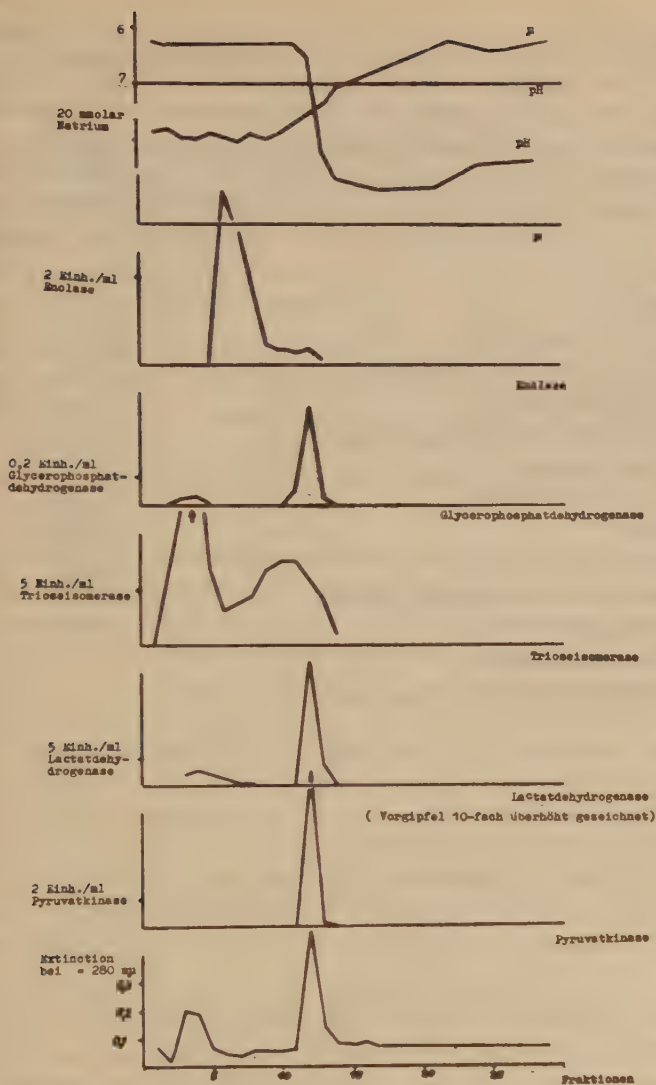


Abbildung 2



Beispiel eines Proteinchromatogramms auf DEAE-Sephadex A 50. Gelbettvol. 7,0 ml, Säulenlänge 120 cm, Elutionszeit 110 Stunde. Der Austauscher war äquilibriert mit EDTA 10 mmolar von pH 7,62 und dann mit dest. H₂O ausgewaschen. Einsatz von 50 μ l entionte Totalextrakt. Konkaver Gradient aus H₂O in der ersten und EDTA 10 mmolar von pH 6,16 in der zweiten Mischkammer. Im Vorratsgefäß EDTA 100 mmolar von pH 6,16, jeweils 7,5 ml.

Bildung 3



Beispiel eines Proteinchromatogramms auf CM-Sephadex C 50.
 Bettvolumen 7,0 ml, Säulenlänge 120 cm, Elutionszeit 100 Stunden.
 Austauscher war äquilibriert mit 10 mmolar EDTA von pH 6,30.
 Zusatz von 50 μl entiontem Totalextrakt. Linearer Gradient aus
 10 ml EDTA 10 mmolar in der Mischflasche und 10 ml Triäthanolamin
 10 mmolar + EDTA 5 mmolar von pH 8,28 in der Vorratsflasche. Fraktions-
 volumen 0,5 ml. (EDTA = Äthylendiamintetraacetat)

Beständigkeit des Proteins.

Vor Beginn der Löslichkeitsmessungen an der Enolase war ihre Beständigkeit in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration zu massen. Dazu wurde das Abklingen der enzymatischen Aktivität als Maß für eine Schädigung des Proteins gemessen und gewertet. Bei den in Abbildung 4 beschriebenen Versuchen zeigte sich, daß der Verlust der Aktivität in saurem Milieu teilweise reversibel ist, diese Reversibilität ist für das Abflachen der Abklingkurven zwischen pH 4 und 5 verantwortlich.

Der durch OH-Ionen induzierte Zerfall der Enolase ist eine Reaktion erster Ordnung, die Säuredenaturierung ist teilweise reversibel und dadurch eine komplexere Reaktion. Im Unterschied zu diesen Befunden fanden Wold und Ballu bei der Hefenolase auch im alkalischen Bereich eine Reversibilität der Denaturierung (13).

Die Empfindlichkeit der Enolase gegen Säuren und Laugen ist bei geringen Ionenstärken ganz außerordentlich gesteigert. Bei einer Ionenstärke von 0,05 waren die Halbwertszeiten gegenüber den in Abbildung 4 beschriebenen Versuchen unterhalb von pH 4 und oberhalb von pH 9 auf weniger als ein hundertstel abgesunken. Das steht in Einklang mit der Vorstellung von der pH-abhängigen Denaturierung als Zerreißen der die Tertiärstruktur stabilisierenden Nebenvalenzen durch die gegenseitige Abstossung der gehäuft vorliegenden und bei geringen Ionenstärken weniger abgeschirmten gleichsinnigen Ladungen. Um pH 6 ist die Enolase auch in Lösung bei geringen Ionenstärken über Wochen im Bereich der Analysenfehler des optischen Tests (etwa 5 % mittlerer Fehler nach graphischer Auswertung) beständig.

Die Kinetik der Einstellung der Lösungsgleichgewichte.

Ist durch die pH-abhängige Denaturierung die Zeitdauer für eine Löslichkeitsmessung an Proteinen nach oben begrenzt, so war auch zu prüfen, wo der Versuchsdauer durch eine eventuelle Verzögerung der Gleichgewichtseinstellung nach kurzen Zeiten hin eine Grenze gesetzt ist. Um diese Zeitspanne zu finden, wurde eine seit einigen Wochen in Kontakt mit frisch kristallisiertem Protein equilibrierte Enolasepräparation durch Zugabe von Wasser und Ammoniumsulfatlösung, wie in der Legende zu Abbildung 6 beschrieben, aus dem Gleichgewicht gebracht und dann das Ein-

stellen der neuen Gleichgewichtslage mit der Zeit verfolgt. Es ergab sich, daß ein gering gestörtes Gleichgewicht nach 24 Stunden noch keine neue Gleichgewichtslage erreicht hat, nach 75 Stunden ist sie erreicht. (Übersättigte Lösungen der Proteine sind durchweg sehr beständig, so daß man von ihnen aus nicht mit einer raschen Gleichgewichtseinstellung rechnen darf.)

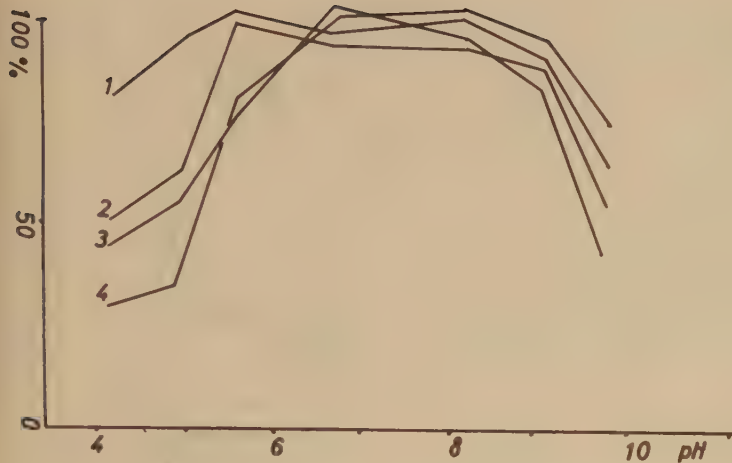
Die pH-Abhängigkeit der Löslichkeit der Enolase.

In Konsequenz der oben beschriebenen Versuche wurde für alle weiteren Löslichkeitsmessungen eine Equilibrierungsdauer von 48 Stunden eingehalten als Kompromiss zwischen dem sich langsam einstellenden Löslichkeitsgleichgewicht einerseits und der beginnenden Proteinschädigung im Überstand bei extremen pH-Werten auf der anderen Seite. Hier läßt sich vorhersehen, daß sich nur mehr ein Fließgleichgewicht einstellen wird zwischen dem Ausfallen von denaturiertem Protein aus dem Überstand und dem Nachströmen aus dem Sediment von nativem Material, wie es als Folge der Phasenregel zu erwarten ist, von der mehrfach, zuletzt von Edsall gezeigt worden ist, daß sie auch für das Löslichkeitsverhalten der Proteine gültig ist (14)

In einem weiteren Versuch wurde zur Stützung dieses Kompromisses die Löslichkeit der Enolase über einen weiten pH-Bereich von pH 4,6 bis 7,9 jeweils 12, 24 und 75 Stunden nach Versuchsbeginn gemessen. Dabei zeigte sich, daß das Verhältnis der Löslichkeiten bei verschiedenen pH-Werten nach 12 Stunden bis in den Bereich der Meßgenauigkeit konstant geworden war. Es ließ sich, wie später beschrieben wird, mathematisch durch eine sehr einfache Funktion beschreiben.

Die Löslichkeit der Enolase wurde im pH-Bereich zwischen 4,58 und 7,90 und zwischen Ammoniumsulfatkonzentrationen von 2,39 bis 2,98 gemessen. Abbildung 7 zeigt den Typus der erhaltenen Kurven in diesem Bereich in gleichem Koordinatenmaßstab. In Abbildung 8 sind die gleichen Versuche wiedergegeben, wobei in der Ordinate die "reduzierte" Löslichkeit (S-So) in logarithmischem Maßstab eingetragen ist.

Bildung 4



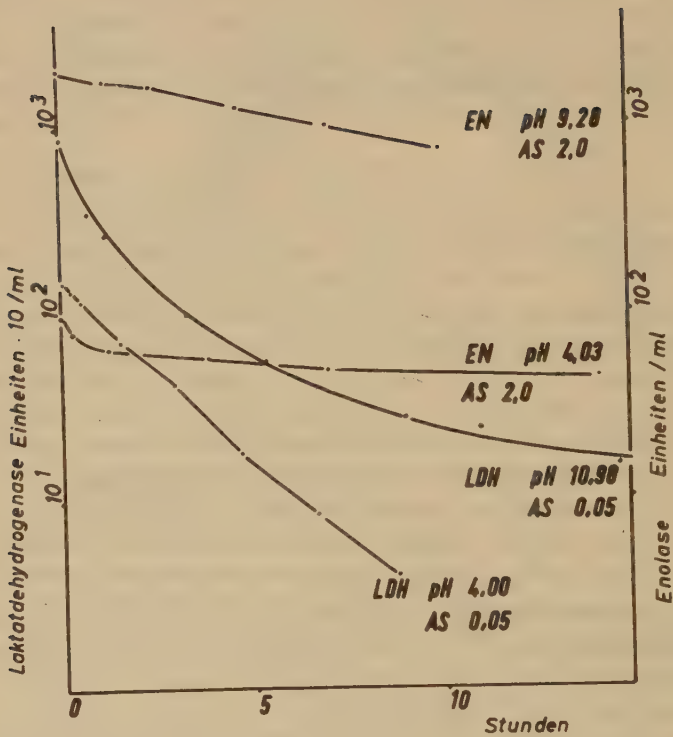
Beständigkeit der Enolase bei verschiedenen Wasserstoffionen-
konzentrationen, gemessen über die Geschwindigkeit des Abklingens
der enzymatischen Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert.

In der Ordinate die noch vorhandene Aktivität in % der Anfangs-
aktivität, in der Abszisse der pH-Wert.

(2 mg Protein/ ml Lösung, Ammoniumsulfatmolarität 2, 1 mg EDTA/ml.)

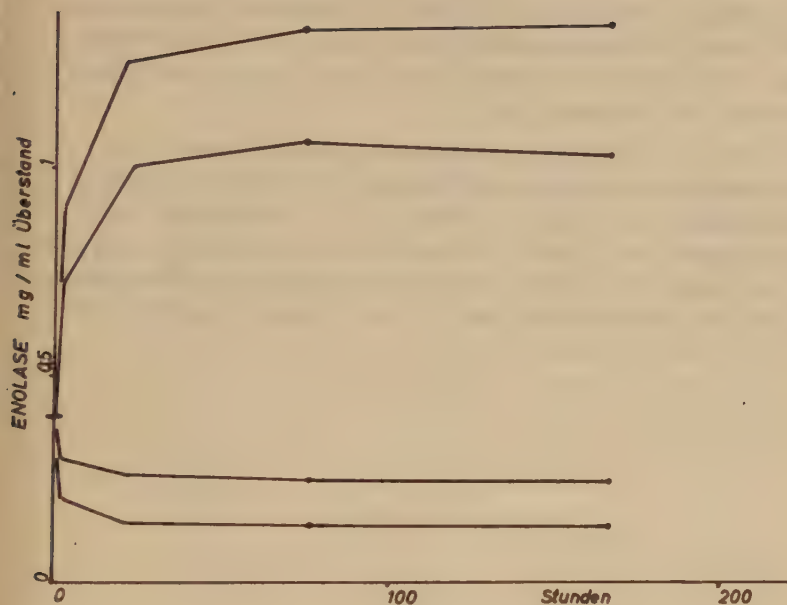
Kurve 1 gibt die nach 2,4 Stunden bei 0 Grad C gemessenen Aktivi-
täten wieder. Kurve 2 wurde nach 70, Kurve 3 nach 142 und Kurve
4 nach 207 Stunden aufgenommen.

Abbildung 5



Abklingen der enzymatischen Aktivität der Enolase und Laktatdehydrogenase mit der Zeit bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen.

Abbildung 6



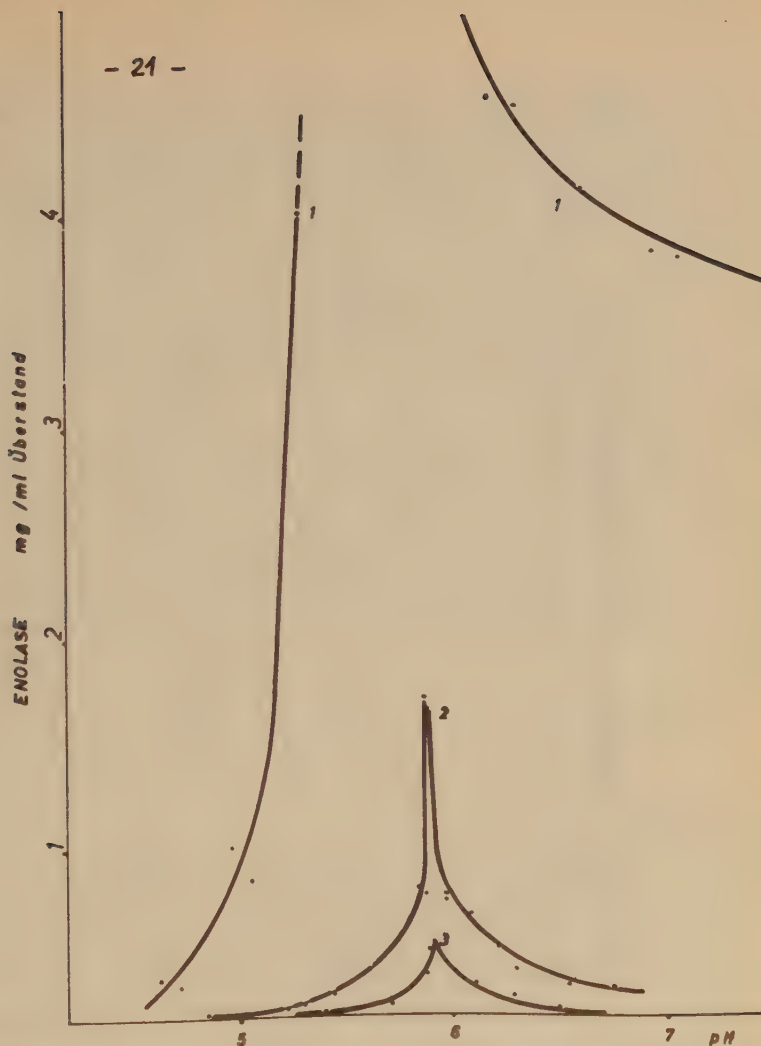
Die Kinetik der Einstellung des Lösungsgleichgewichts bei der Enolase. Zu Beginn des Versuchs stand eine Proteinlösung von 0,41 mg Protein / ml Überstand im Lösungsgleichgewicht bei pH 6,13 und einer Ammoniumsulfatmolarität von 2,47, (bei 11 mg Protein / ml Suspension, spezifische Aktivität 71 I. E.) Dann wurde durch Zugabe von Wasser oder gesättigter Ammoniumsulfatlösung vom gleichen pH-Wert die Salzkonzentration auf folgende neue Werte geändert: 2,39, 2,43, 2,52 und 2,56 molar. Dann wurde die Änderung der enzymatischen Aktivität im Überstand mit der Zeit verfolgt.

Die Fällungsformen der Enolase.

Das Kristallbild der Enolase ist auf beiden Seiten des Löslichkeitsgipfels verschieden. Unterhalb von pH 5,9 entsteht ein sehr feines, nadeliges Präparat, in dem die Querdimensionen der etwa 1/500 mm langen "Haare" unter dem Auflösungsvermögen lichtoptischer Mikroskope bleibt, so daß das Gesamtbild schlecht zu erkennen ist.

Oberhalb von pH 5,9 fallen raschwüchsige Nadeln aus, die 1/10 mm Länge erreichen können und dann die Gestalt schmaler Platten annehmen. Sie sind in Figur 9 c in 100-facher Vergrößerung abgebildet. Um die Fällungsform der "sauren Enolase" weiter zu charakterisieren, wurde sie elektronenoptisch untersucht. Sie ist in Figur 9 a und 9 b in 20 000 - und 60 000 - facher Vergrößerung abgebildet.

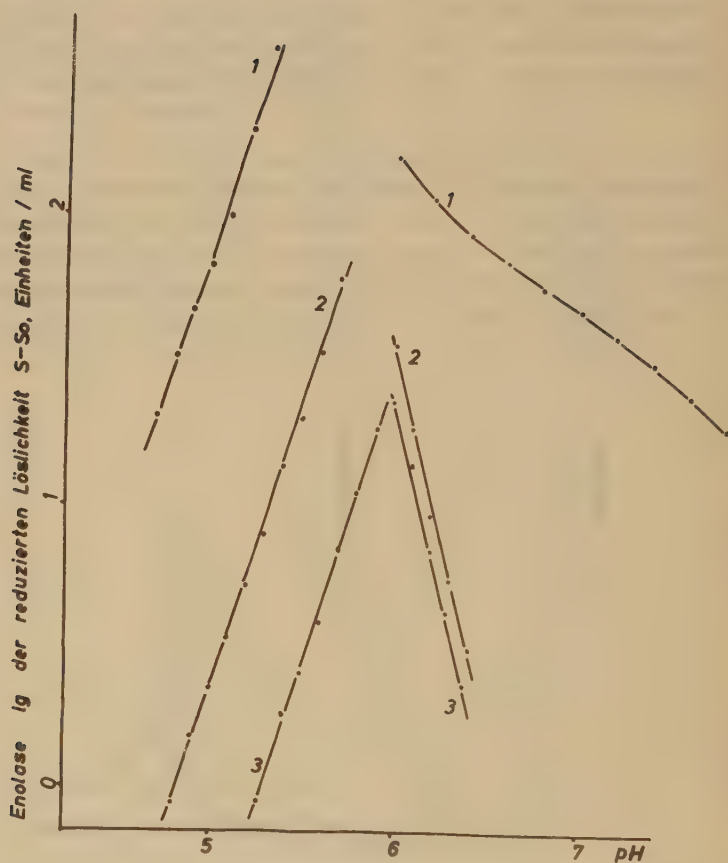
Abbildung 7



Die Löslichkeit der Enolase in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Ionenstärke.

In der Ordinate die Löslichkeit in mg Biuretprotein/ ml Lösung. In den Ansätzen jeweils 6,5 mg Protein/ ml Suspension mit einer spezifischen Aktivität von 65 I. E. / mg Protein. Kurve 1 in 2,39 molar Ammoniumsulfat, Kurve 2 in 2,71 und Kurve 3 in 2,98 molar Ammoniumsulfat. In allen Ansätzen 1 mg Äthylendiamintetraessigsäure / ml Lösung, Temperatur 1 - 3 Grad C.

Abbildung 8



Die pH-Abhängigkeit der Löslichkeit der Enolase.
Die gleichen Versuche wie in Abbildung 7. In der Ordinate ist in logarithmischem Maßstab die Differenz zwischen der jeweiligen Löslichkeit und der Löslichkeit in den beiderseitigen entsprechenden Minimalplateaus der Löslichkeit - hier gemessen über die enzymatische Aktivität - aufgetragen.

Beide Fällungsformen zeigen im Polarisationsmikroskop optische Anisotropie. Im Röntgendiagramm nach Debye und Scherrer wurden nur von der mikroskopisch kristallinen Form Reflexe erhalten. Die feinfädige Form, die von nun an pH-5-Form heißen soll nach dem pH-Wert, bei dem sie gefällt werden kann, gab keine Interferenzen.

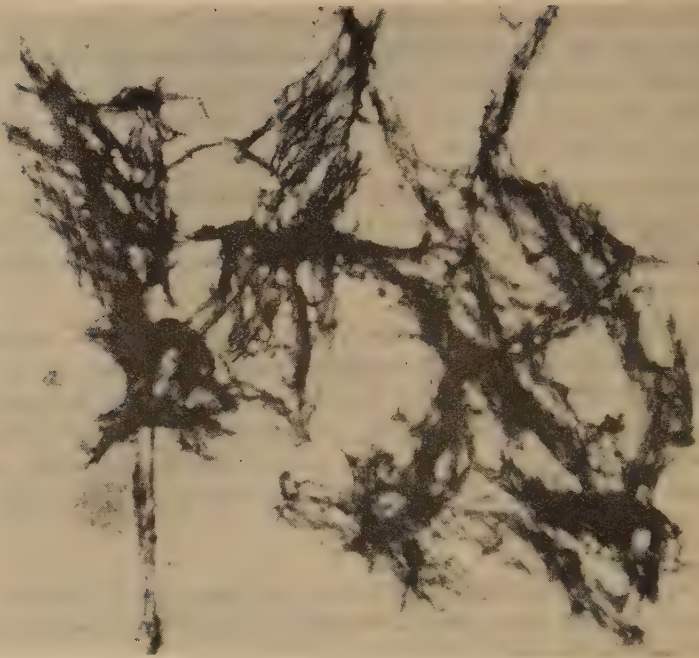
Sie wurde auch auf ein Elektronenbeugungsdiagramm hin untersucht und gab dort Reflexe, aus deren Schärfe auf eine nur wenige Moleküllagen dicke Periodizität der Gitterbausteine geschlossen werden konnte.

Mit den beiden Fällungsformen wurden wechselseitige Impfversuche durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß ein bei pH 6,5 kristallisiertes Präparat - die pH-6,5-Form - die Kristallisation aus einer übersättigten Lösung bei pH 6,5 sofort induzierte, während die pH-5-Form ebenso wie in den nicht geimpften Blindproben erst nach einigen Tagen zu einer beginnenden Kristallisation führte.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. W. Hoppe (Abteilung für Röntgenstrukturforschung am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München) herzlich für seine freundliche Hilfe bei der Aufnahme der Röntgendiagramme danken.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen und das Elektronenbeugungsdiagramm wurden im Laboratorium für Elektronenmikroskopie der Philippsuniversität in Marburg angefertigt. Ich danke Herrn Dr. W. Vogell für seine freundliche Hilfe.

Abbildung 9 a



Die Fällungsformen der Enolase in Ammoniumsulfat

In Abbildung 9 a ein bei pH 5,3 gefälltes Präparat, fixiert und kontrastiert mit Osmiumtetroxyd und elektronenoptisch 20 000-fach vergrößert. In Abbildung 9 b das gleiche Präparat, fixiert mit Osmiumtetroxyd und negativ angefärbt mit Phosphorwolframsäure, 80 000-fach vergrößert. In Abbildung 9 c die Fällungsform auf der alkalischen Seite des Löslichkeitsmaximums lichtoptisch 100-fach vergrößert.

Abbildung 9 b

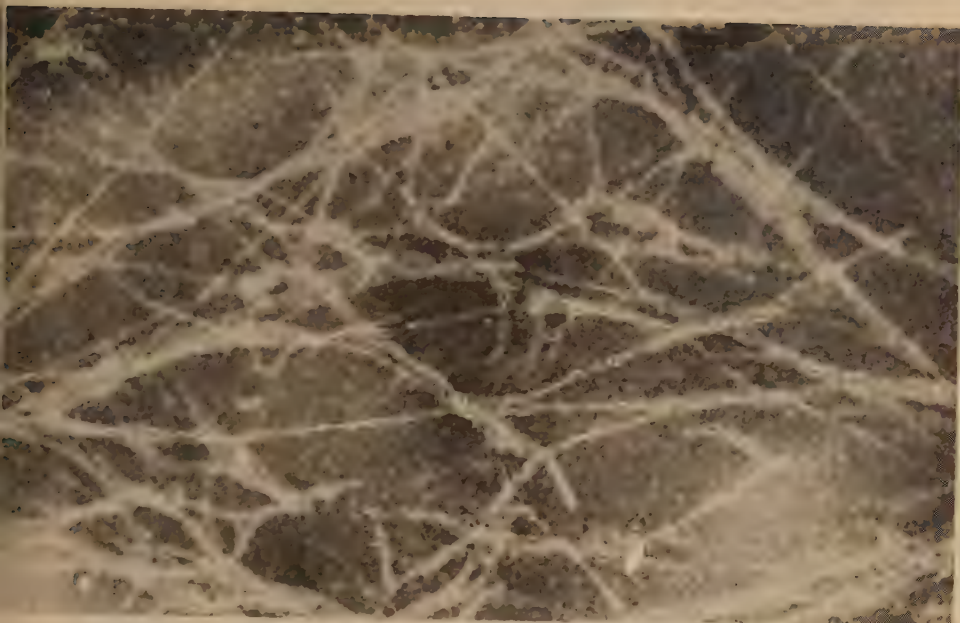
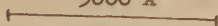


Abbildung 9 a

5000 Å



Die Beziehungen zwischen der pH-Abhängigkeit der Löslichkeit und anderen pH-abhängigen Eigenschaften der Enolase.

Um einem Verständnis des pH-Ganges der Löslichkeit der Enolase näher zu kommen, wurde er mit der pH-Abhängigkeit anderer Proteineigenschaften verglichen. Sie sind im Folgenden einzeln beschrieben, der Hauptteil der Aussagen ist dabei den Abbildungen überlassen worden.

Die pH-Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität der Enolase.

Die Enolase katalysiert die Umsetzung von 2-Phosphoglycerinsäure in Phosphoenolpyruvat und Wasser. Es wurde die Geschwindigkeit dieser Umwandlung in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration über die Extinction der Enolgruppierung bei 240 μ gemessen. Abbildung 10 beschreibt das Ergebnis. Danach weisen Lage und Form der Aktivitätskurve keine Besonderheit und Beziehung zum pH-Gang der Löslichkeit auf.

Die spezifische Pufferkapazität der Enolase.

Da alle pH-abhängigen Löslichkeitsänderungen der Proteine primär auf die Anlagerung von Protonen an "Festbasen" im Molekül zurückgehen müssen, wurde eine Titrationskurve der Enolase aufgenommen. In Abbildung 8 a ist die Titrationskurve und die daraus entnommene pH-Abhängigkeit der spezifischen Pufferkapazität wiedergegeben. Sie sind vom normalen Proteintyp und lassen keine nähere Beziehung zum pH-Gang der Löslichkeit erkennen.

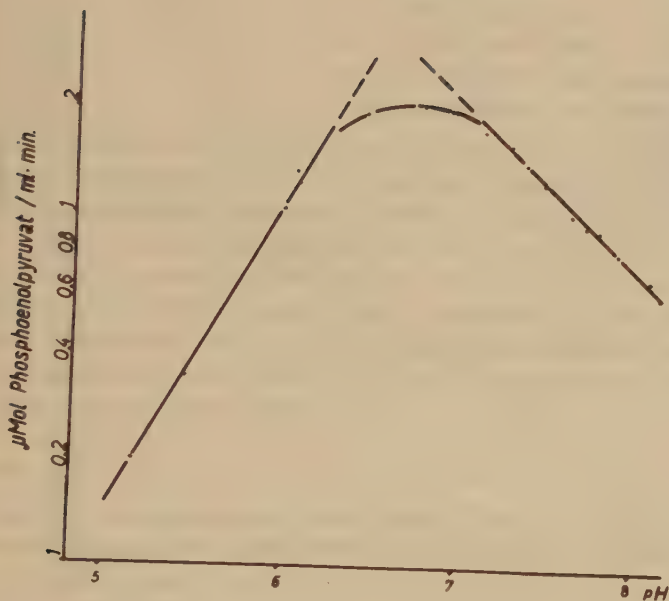
Die optische Aktivität der Enolase.

Ausgehend von der Überlegung, daß Architekturänderungen im Proteinmolekül als Ursache für die Löslichkeitsänderungen mit der Wasserstoffionenkonzentration verantwortlich sein könnten, wurde der pH-Gang der optischen Aktivität der Enolase von pH 5,22 bis 6,64 gemessen. Sie erwies sich als nicht pH-abhängig. Die spezifische Aktivität betrug $26,1 \pm 0,05$ Grad.

Die Viskosität der Enolase.

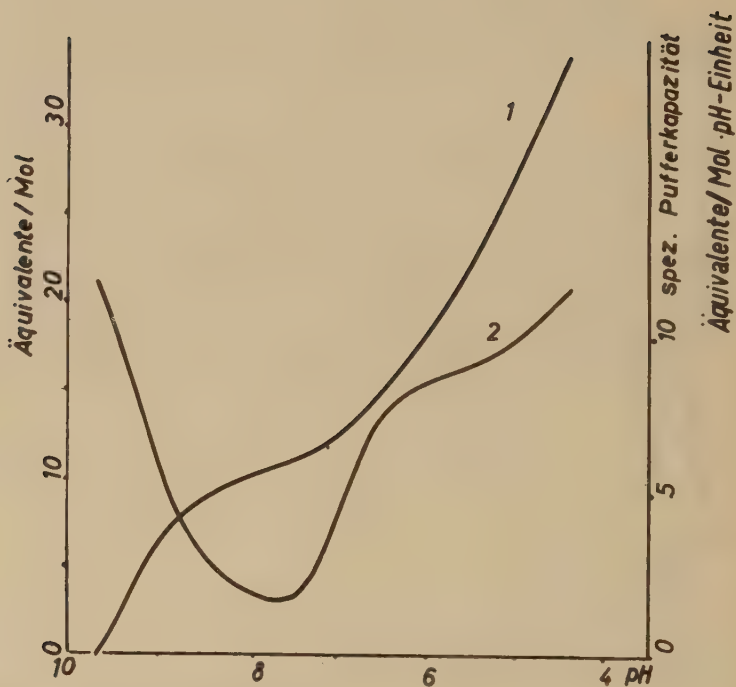
Ähnlich wie in der optischen Aktivität äußert sich auch in der Viskosität die spezifische Architektur der Proteine. Beide werde

Abbildung 10



Die pH-Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität der Enolase. Die Ordinate zeigt den Logarithmus der Reaktionsgeschwindigkeit zum Start der Reaktion, gemessen über die Extinction des Phosphoenolpyruvats bei $\lambda = 240 \text{ m}\mu$, korrigiert für die pH-Abhängigkeit des Extinktionskoeffizienten. Im Testansatz: Imidazolpuffer 50 millimolar, MgSO_4 30 millimolar, 2-Phosphoglycerinsäure 0,6 millimolar.

Abbildung 11



Die Titrationskurve der Enolase.

Ein ml Proteinlösung mit 3,2 mg Enolase wurde entiont und karbonatfrei gemacht, mit 0,04 ml n/50 NaOH versetzt und mit n/50 H_2SO_4 titriert. In der linken Ordinate die gebundenen Äquivalente H^+ / Mol Protein (Kurve 1), in der rechten Ordinate die aus der Titrationskurve entnommene pH-Abhängigkeit der spezifischen Pufferkapazität.

durch die Zerstörung der definierten Tertiärstruktur bei der Säure- oder Alkalidenaturierung tiefgreifend verändert.

Nach einer Viskositätsbeziehung von Einstein besteht für kugelförmige Moleküle zwischen Volumen und relativer Viskosität ihrer Lösung folgende Beziehung:

$$\frac{\eta}{\eta_0} = 1 + 2,5 \frac{N}{V} \cdot v$$

mit N = Teilchenzahl
 V = Volumen
 v = Partikelvolumen
 η = Viskosität der Lösung
 η_0 = Viskosität des Lösungsmittels

Eine Überschlagsrechnung zeigt, daß für Makromoleküle $\frac{N}{V} \cdot v$ groß gegen 1 ist. Nimmt man weiter an, daß ein Proteinmolekül in seinen Hydrathüllen weitgehend kugelförmig ist, so sollte eine Viskositätsmessung mit einem Meßfehler von unter 10 % eine Volumenänderung sichtbar machen, die 10 % übersteigt. Deshalb wurde die pH-Abhängigkeit der Viskosität der Enolase gemessen. Es ergab sich - unabhängig von der Wasserstoffionenkonzentration eine spezifische Viskosität von 0,25 in 50 mM Ammoniumsulfat und bei 3,7 mg Protein / ml Lösung.

Das spezifische Gewicht der Enolase.

pH-abhängige Unterschiede im Energieinhalt der Fällungsformen sollten sich auch in Unterschieden im spezifischen Gewicht äußern. Es gelang nicht, mit der Technik der hochtourigen Zentrifugation im Dichtegradienten solche Unterschiede aufzuzeigen.

Die Titration bei hohen Ionenstärken.

Zur Titration bei hohen Ionenstärken wurden etwa 100 mg Enolaseprotein im Mikrotitrierstand T 30 der Firma Radiometer in 2 ml Lösung mit 1n H_2SO_4 mit einer automatischen Bürette titriert und der pH-Wert mit einem Philips-Schreiber zur graphischen Auswertung registriert. Eine proteinlose Blindprobe wurde ebenso behandelt.

Das Myoglobin.

Das Pottwalmyoglobin ist durch die Röntgenstrukturanalysen von Kendrew eines der am besten bekannten Proteine mit annähernd vollständig aufgeklärter Tertiärstruktur geworden. Es erlaubt weiter durch Einführung verschiedener Liganden am Häm mit einfachen Mitteln Faktoren zu setzen, die die pH-Abhängigkeit der Löslichkeit beeinflussen können. Deshalb wurde das Myoglobin in den Kreis der hier betrachteten Proteine aufgenommen.

Die wichtigsten der von Kendrew vorgelegten Ergebnisse seien hier wiedergegeben: 70 % der Aminosäurekette liegt in Form der α -Helix vor, dazwischen mindergeordnete Bereiche. Die vier vorhandenen Prolineinheiten verursachen Knickstellen. Das Molekülinnere ist weitgehend hydrophoben Anteilen vorbehalten, während die polaren Seitenketten weitgehend nach außen gewendet sind. Von den 11 Histidinresten finden sich 7 bis 8 mit wenigstens einem Stickstoffatom in der Proteinoberfläche, der Rest ist begraben. Auch das Häm ist in eine Tasche der Faltung versenkt. Das ganze Molekül wird durch eine sehr große Zahl von heteropolaren, Wasserstoff- und Van der Waalschen Bindungen stabilisiert. Die Stabilisierung fixiert dagegen nur zum Teil die aus der Oberfläche hervorragenden polaren Seitenketten (15, 16, 17, 18).

Im Kristall berühren sich die Proteineinheiten nur an wenigen Punkten, das Lösungsmittel hat Zugang zu den interkristallinen Kanälen. Auf ein Molekül des aus 3-molarer Ammoniumsulfatlösung auskristallisierten Proteins entfallen 20 bis 30 Sulfatanionen im Kristall, fast alle sind statistisch verteilt. 170 Wassermoleküle liegen in der Peripherie, kaum eines im Molekülinneren.

Die meisten, vielleicht alle reaktiven Gruppen, sind auch in kristallisiertem Zustand chemischen Reaktionen zugänglich.

Das Molekulargewicht beträgt 17 816. Pottwalmyoglobin in der Zyanmetform läßt sich chromatografisch in 12 Komponenten aufspalten, die sich spontan ineinander umwandeln können. Die beiden Hauptkomponenten enthalten 8 Moleküle Asparaginsäure, 19 Glutaminsäure- und 12 Histidinreste. Einer der Histidinreste ist mit einer freien Koordinationstelle des Eisens verbunden.

Die Tertiärstruktur ändert sich wahrscheinlich nicht beim Lösungsvorgang.

Die Löslichkeit des CO-Myoglobins.

Unterhalb von pH 6 läßt die Stabilität des Myoglobins merklich nach. (Pers. Mitteilung Dr. G. Braunitzer) Die Auswertung einer bei pH 5,1 aufgenommenen Abklingkurve der Löslichkeit ergab, daß pro Tag 1,0 % des Proteins in eine irreversible unlösliche Form überging. Darauf wurde der untersuchte pH-Bereich auf pH 5,2 bis 8,5 eingeengt. In diesen Grenzen wurde die Ammonsulfatmolarität von 3,04 bis 3,60 variiert. Die erhaltenen Löslichkeitskurven ließen sich wie bei allen untersuchten Proteinen durch geeignete Wahl des Ordinatenmaßstabs zur Deckung bringen. Die in Abbildung 13 wiedergegebene Kurve überspannt den ganzen zugänglichen pH-Bereich. CO-Myoglobin kristallisiert in großwüchsigen schmalen Platten, die in Abbildung 17 d wiedergegeben sind.

Die Löslichkeit des Metmyoglobins.

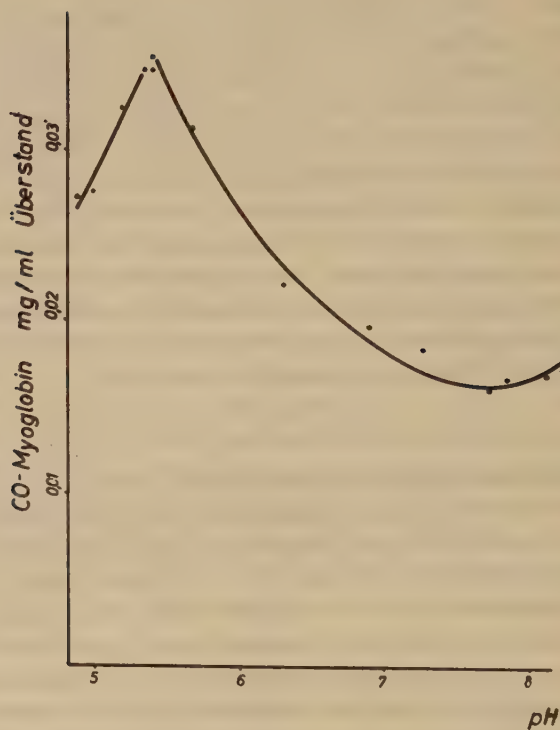
Das Pottwalmetmyoglobin wurde in zwei verschiedenen Fällungsformen in die Löslichkeitsmessungen eingesetzt, einmal als lyophilisiertes amorphes Präparat, einmal aus Ammonsulfat umkristallisiert, um zu prüfen, ob die geometrische Anordnung der Gitterbausteine die Löslichkeit und ihre pH-Abhängigkeit beeinflusst. Das erwartete Ergebnis wurde bestätigt: Die Löslichkeit des kristallinen Präparats ist bei ähnlicher Ionenstärke erniedrigt, der Löslichkeitstopf wird tiefer. Das Ergebnis schließt nicht aus, daß Umbauten im Kristallgitter, wenn sie Folgen des Dissoziationsgrades sind, sich in Löslichkeitsänderungen äußern. Der weiter oben beschriebene Löslichkeitsgipfel des CO-Myoglobins bei pH 5,65 findet sich nicht wieder. Abbildung 14 beschreibt die Ergebnisse.

Metmyoglobin kristallisiert ebenso leicht und in ähnlichen Kristallen wie CO-Myoglobin. Abbildung 15 zeigt in einer Kurvenschar die Löslichkeit der kristallinen Form in Funktion von Ionenstärke und Wasserstoffionenkonzentration.

Die Löslichkeit des Cyanmetmyoglobins.

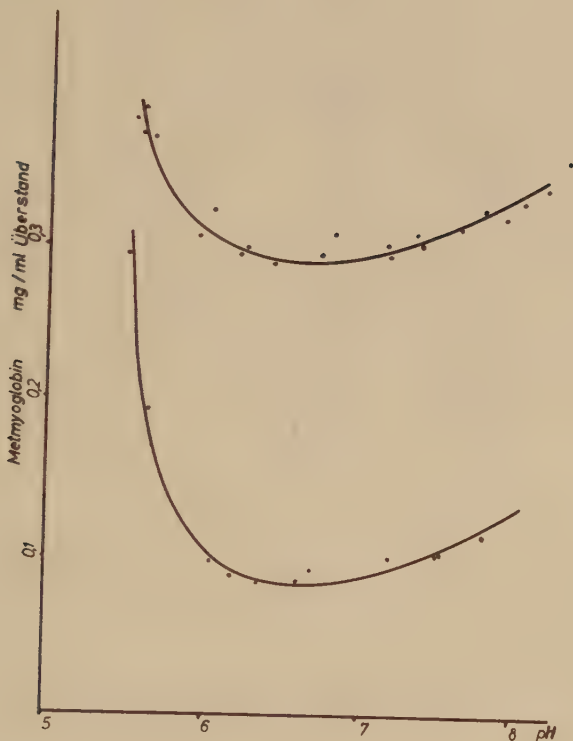
Cyanmetmyoglobin ist die stabilste Myoglobinvariante. Deshalb konnte hier der untersuchte pH-Bereich bis nach pH 4,75 ausgelehnt werden. Es ergab sich ein ähnlicher pH-abhängiger Löslichkeitsverlauf wie für das CO-Myoglobin, jedoch um etwa 0,1

Abbildung 13



Die pH-Abhängigkeit der Löslichkeit des CO-Myoglobins.
 Im Ansatz 5,1 mg Protein pro ml Suspension und 3,60 Mol
 Ammoniumsulfat/Liter.

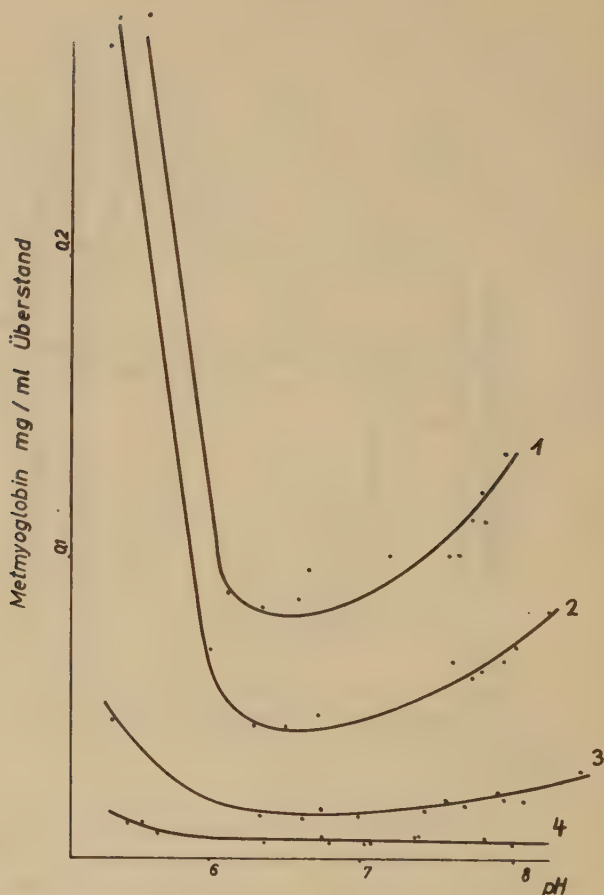
Abbildung 14



Vergleich der pH-Abhängigkeit der Löslichkeit von amorphem und kristallisiertem Pottwalmetyoglobin.

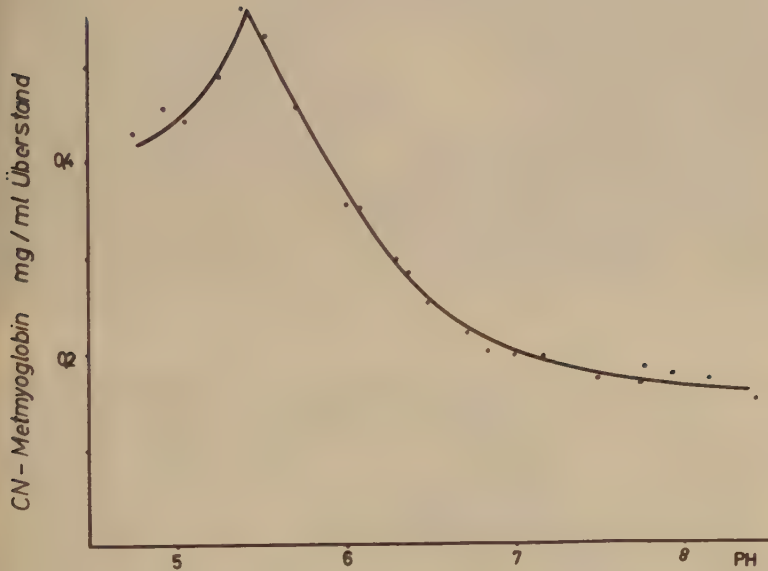
In der oberen Kurve die Löslichkeit von amorphem Metyoglobin bei einer Ammoniumsulfatmolarität von 2,93. In der unteren Kurve die Löslichkeit von kristallisiertem Metyoglobin bei einer Ammoniumsulfatmolarität von 3,06.

Abbildung 15



Die pH-Abhängigkeit der Löslichkeit des Pottwalmetmyoglobins. Die Proteinkonzentration im Überstand wurde über die Extinction bei 412 mμ bei pH 6,0 bestimmt. Im Ansatz 13,2 mg Metmyoglobin. Die Ammoniumsulfatmolarität war in den Ansätzen zu den Kurven 1 bis 4 3,06, 3,13, 3,28, und 3,45.

Abbildung 16



Die pH-Abhängigkeit der Löslichkeit des Cyanmetmyoglobins. Die Proteinkonzentration im Überstand wurde über die Extinction bei 412 m μ und bei pH 6,0 bestimmt. Im Ansatz 3,3 mg Protein/ ml Suspension. Ammoniumsulfatmolarität 3,14.

Abbildung 17 a

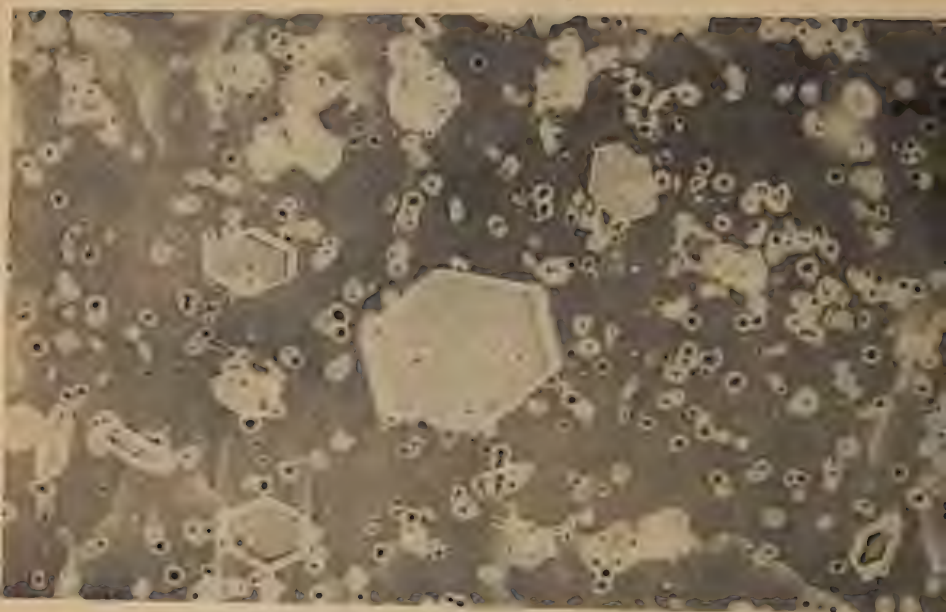


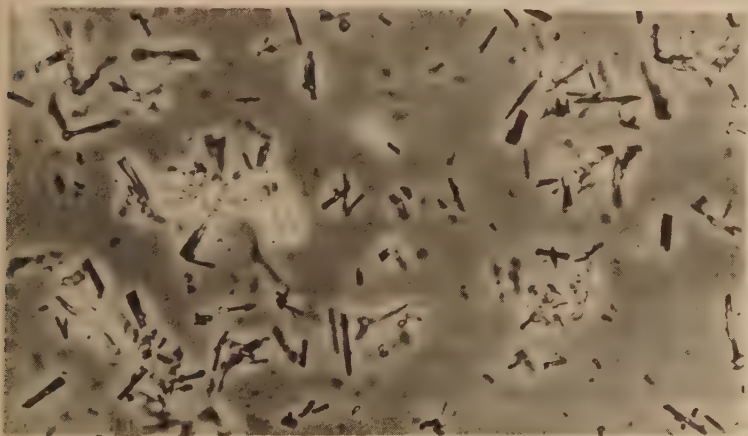
Abbildung 17 b



Abbildung 17 c



Abbildung 17 d



Die Kristallformen der Myoglobinderivate

In Abbildung 17 a CN-Metmyoglobin, kristallisiert bei pH 5,2 ,
in 17 b CN-Metmyoglobin, kristallisiert oberhalb von pH 5,7 ,
in 17 c Metmyoglobin kristallisiert bei pH 6,9 und in 17 d
CO-Myoglobin kristallisiert bei pH 6,9, alle aus Ammoniumsulfat.
Vergr. von a und b 100-fach, von c 200-fach und von d 250-fach.

bis 0,2 pH-Einheiten nach niederen Werten hin verschoben. Abbildung 16 zeigt den Gang der Löslichkeit,

Cyanmetmyoglobin kristallisiert oberhalb und unterhalb des Löslichkeitsgipfels in verschiedener Tracht, oberhalb in Rhomben, unterhalb wieder in Rhomben, jedoch mit abgestutzten Ecken, die Kristallisate werden in Abbildung 17 vorgestellt.

Die stumpfen Rhombenwinkel sind nach Messungen an den fotografischen Aufnahmen in beiden Fällen gleich. Umstellen des pH-Wertes der Kristallsuspensionen in Bereiche, in denen die andere Form aus der Lösung ausfällt, führte innerhalb von 2 Monaten zu keiner Änderung des Kristallbildes.

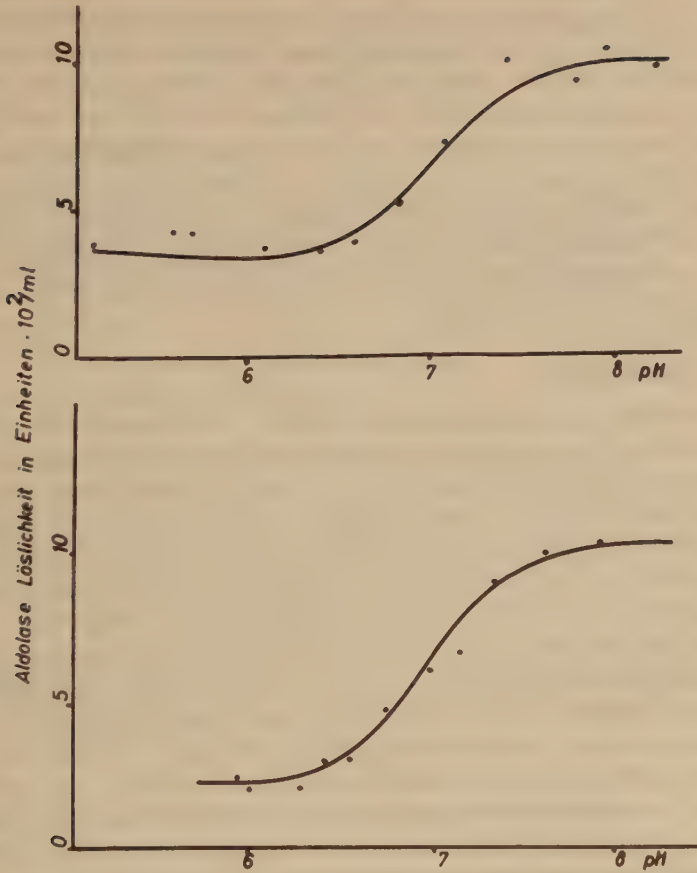
Die Fruktose-1,6-Diphosphataldolase (Aldolase) .

Aldolase aus Kaninchenmuskel wurde zuerst von Baranowsky kristallisiert. Die höchste spezifische Aktivität erhielt Czok mit 48 I. E. pro Milligramm Protein (unveröffentlicht) . Das Molekulargewicht beträgt $148 \pm 1 \cdot 10^3$. Der isoelektrische Punkt liegt um pH 6,1. Das Protein wandert in der freien Elektrophorese bei pH 8,2 als einheitlicher Gipfel. Aldolase ist bemerkenswert stabil gegen extreme pH-Werte und Aufbewahrung in hochverdünnten Lösungen. Bei pH 2 bis drei zerfällt das Molekül reversibel in 3 Untereinheiten, die keine dreidimensionale Ordnung mehr erkennen lassen. Diese rekombinieren beim Zurückstellen des pH in den Neutralbereich zu einem der nativen Aldolase bemerkenswert ähnlichen Molekül von enzymatischer Aktivität. Aldolase enthält 20 freie SH-Gruppen im Molekül und ist empfindlich gegen Schwermetallspuren. Bei Stehen fällt die spezifische Aktivität auf etwa die Hälfte ab, ohne daß die Kristallisationseigenschaften davon beeinflusst würden. Aldolase kristallisiert im pH-Bereich um 6 in hexagonalen Bipyrididen, um pH 7,5 entstehen schmale Platten. (19, 20, 21, 22, 23, 24, 25)

Die pH-Abhängigkeit der Löslichkeit der Aldolase.

Aldolase zeigte in 24 Stunden im pH-Bereich von 4 bis 10 keine Aktivitätsverluste. Darauf wurde die Löslichkeit von pH 5,0 bis 8,5 an einem in Bipyramiden vorliegenden Präparat von einer spezifischen Aktivität von 29 I. E. pro mg Protein bei einer Ammoniumsulfatkonzentration von 1,60 gemessen. Figur 18 be-

Abbildung 18



Die pH-Abhängigkeit der Löslichkeit der Aldolase.

Zwei Ansätze mit je 15,2 mg Protein/ ml Suspension mit einer spezifischen Aktivität von 30 I. E., Ammoniumsulfatmolarität 1,60.

schreibt den Gang der Löslichkeit. Einen ganz ähnlichen pH-Gang nimmt die optische Aktivität des β -Laktoglobulins von pH 7,5 bis 8,5 (26) Die spezifische optische Aktivität der Aldolase ist dagegen nicht pH-abhängig im Bereich ihres Löslichkeitsanstiegs und beträgt 14,9 Grad bei 25°C und $\lambda=589 \text{ m}\mu$. Alle Proben zeigten bei Ende der Versuche zertrümmerte Bipyramiden. Möglicherweise wurde daher im alkalischen Bereich die Löslichkeit einer hier metastabilen Form gemessen, es ist aber auch denkbar, daß sich die Proteinmoleküle umgeordnet haben im Nahbereich unter Beibehaltung der mikroskopisch sichtbaren Kristallgestalt.

Die Pyruvatkinase.

Pyruvatkinase aus Kaninchenskelettmuskel wurde zuerst von Kornberg und Pricer kristallin erhalten. Die Kristalle haben die Form äußerst feiner Nadeln, wie sie für die saure Form der Enolase beschrieben wurden. Tietz und Ochoa schalteten einen Hitzeschritt und eine Äthanolfraktionierung in die Präparationsschritte ein und erhielten ein bipyramidales Kristallisat. Die Angaben über das Molekulargewicht schwanken zwischen 166 000 und 235 000 (27, 28, 29, 30, 31). Eine eigene Messung der Wanderungsgeschwindigkeit bei einer Gelfiltration an Sephadex-Gel G 200, zeigte, daß die Pyruvatkinase rascher wandert als alle anderen hier besprochenen Glycolyseenzyme, sie konnte so in einer maximalen spezifischen Aktivität von 270 I. E. pro mg Protein in einem Schritt aus einem Totalextrakt isoliert werden. Dies Ergebnis stützt das höhere Molekulargewicht, da schon die Aldolyse ein Molekulargewicht von 148 000 aufweist. Pyruvatkinase zerfällt oberhalb von pH 12 in mehrere Untereinheiten (32). Ihr isoelektrischer Punkt liegt in Phosphatpuffer von der Ionenstärke 0,1 bei pH 5,98 (33), das Optimum der enzymatischen Aktivität bei pH 8,5 (34).

Bei pH 7,5 wurde gelegentlich eine Kristallisation in langen hexagonalen Platten beobachtet, (35) die elektrophoretische Beweglichkeit ist von pH 5,6 bis 7,8 linear vom pH-Wert abhängig. Das Protein ist elektrophoretisch homogen (36).

Die pH-Abhängigkeit der Löslichkeit der Pyruvatkinase.

Pyruvatkinase zeigte von pH 5,0 bis 9,5 in 24 Stunden keine merklichen Aktivitätsverluste, die Löslichkeit wurde darauf

von pH 5,1 bis 7,9 gemessen. Abbildung 19 beschreibt eine typische Löslichkeitskurve, gewonnen mit einem Präparat von einer spezifischen Aktivität von 290 I. E. pro mg Protein, sie wird hier zum ersten Mal beschrieben.

Die Triosephosphatisomerase.

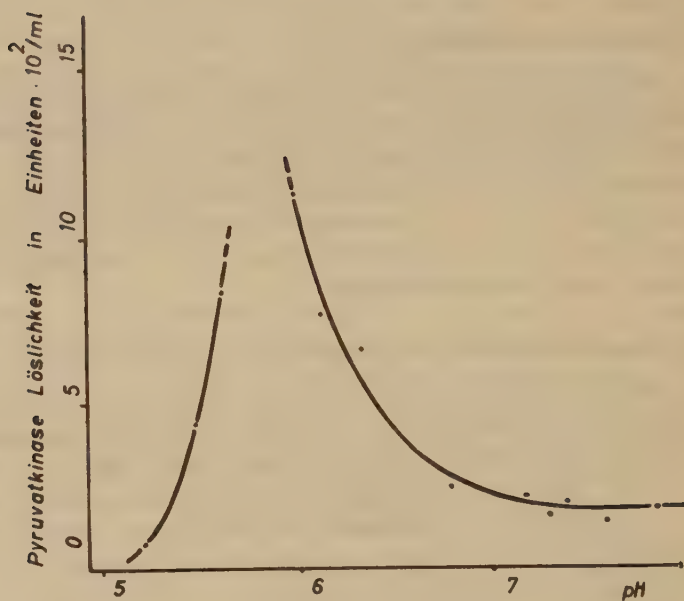
Triosephosphatisomerase wurde zuerst von Czok und Bücher aus Kaninchenskelettmuskel kristallisiert. Das kristalline Präparat enthält nach ihren Angaben ein zweites Protein ohne enzymatische Aktivität. Die höchste bisher beschriebene Aktivität beträgt 5400 I. E., das Molekulargewicht liegt wahrscheinlich um 50 000 (H. Siess, unveröffentlicht). Im übrigen ist das Protein noch wenig untersucht.

Die pH-Abhängigkeit der Löslichkeit der Trioseisomerase.

Trioseisomerase zeigte von pH 4,5 bis 9,5 in 24 Stunden keine merklichen Aktivitätsverluste. Die Löslichkeit ist in diesem Bereich mit dem pH-Wert so stark veränderlich, daß es vorgezogen wurde, den ganzen zugänglichen pH-Bereich, in dem das Enzym stabil ist, in zwei Ansätzen verschiedener Ammonsulfatkonzentration zu überspannen. In Abbildung 21 werden die Ergebnisse beschrieben, gewonnen mit einem Präparat von einer spezifischen Aktivität von 4 400 I. E..

Das Protein kristallisiert in Form von hexagonalen Bipyramiden bei pH 6,5. Nach Entsalzen auf einer Filtergelsäule Sephadex G 50 konnte es bei pH 6,6 in Form schmaler Platten von maximal 0,1 mm Länge mit Ammonsulfat kristallisiert werden. Nach Dr. H.J.Mitzkat (pers. Mitteilung) formen sich die Bipyramiden auch bei pH 7,5 spontan in Nadeln um.

Abbildung 19

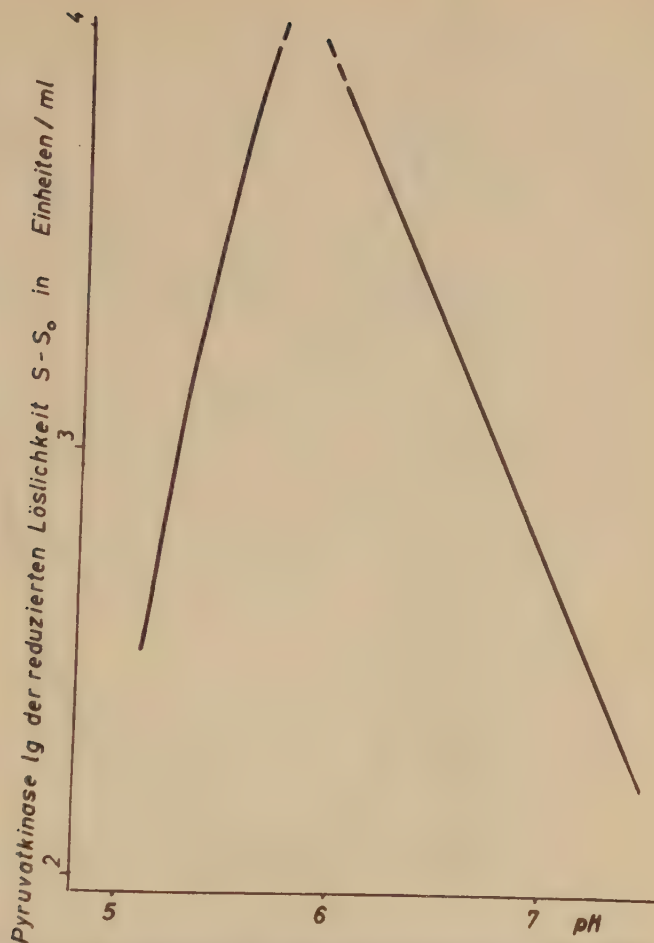


Die pH-Abhängigkeit der Löslichkeit der Pyruvatkinase.

Im Ansatz 24,8 mg Protein / ml Suspension mit einer spezifisch

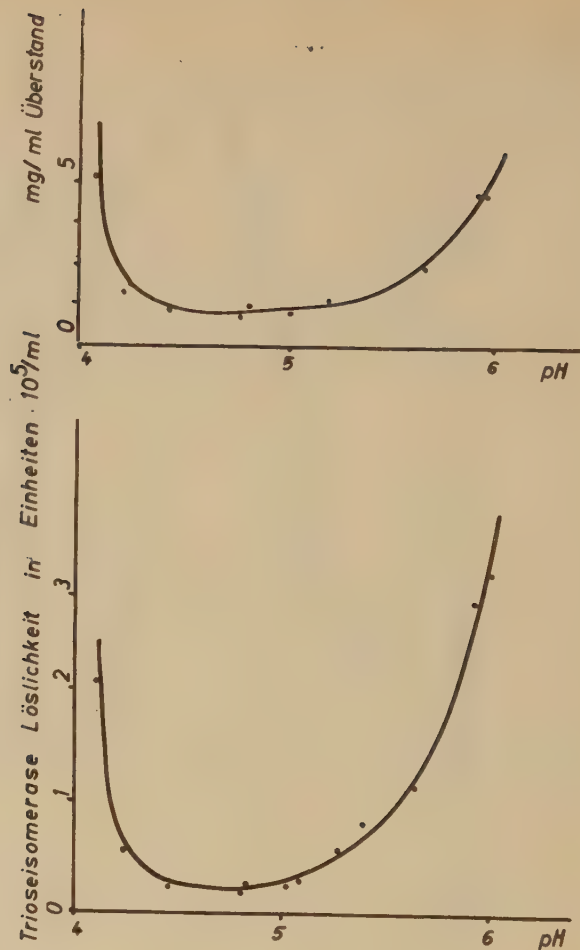
Aktivität von 290 I.E. Ammoniumsulfatmolarität 2,10.

Abbildung 20



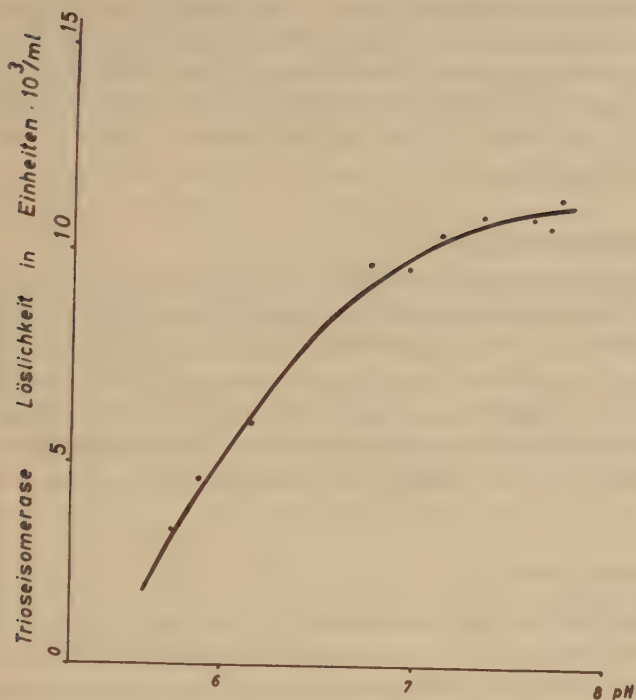
Die pH-Abhängigkeit der Löslichkeit der Pyruvatkinase.
 In der Ordinate die Löslichkeit in logarithmischer Auftragung
 abzüglich der Löslichkeit in den zu jedem Kurvenast gehörenden
 "Minimalplateaus", wo die Löslichkeit für den linken Ast gleich
 0, für den rechten gleich 13 I.E./ml Überstand gesetzt wurde.
 Die Werte wurden der Ausgleichskurve der Abbildung 19 entnommen.

Abbildung 21



Die pH-Abhängigkeit der Löslichkeit der Trioseisomerase. Im Ansatz 12,5 mg Protein/ ml Suspension mit einer spezifischen Aktivität von 4650 I.E., Ammoniumsulfatmolarität 2,15 . In der oberen Kurve ist die Löslichkeit gemessen über die Proteinkonzentration im Überstand, in der unteren über die enzymatische Aktivität. Die Löslichkeit wurde bei allen Enzymen auch über die Proteinkonzentration bestimmt, wich aber nur bei der Trioseisomerase wesentlich von den aus der enzymatischen Aktivität erhaltenen Werten ab. (Wegen der im Text erwähnten Säureempfindlichkeit gilt die Kurve erst ab pH 5 quantitativ.

Abbildung 22



Die pH-Abhängigkeit der Löslichkeit der Trioseisomerase.
Im Ansatz das gleiche Präparat wie zu Abbildung 21, aber höhere Ammoniumsulfatkonzentration von 2,39 molar, um Anschluss an die Löslichkeit aus Abbildung 21 zu bekommen, wo sie bei pH 6 extrem groß wird. Die spezifische Aktivität ist im Verlauf der Messungen zu den Werten der Abbildung 21 auf 4 350 I. E. gefallen.

Zu allen hier beschriebenen Enzymen wurde die Löslichkeit nicht nur über die enzymatische Aktivität, sondern auch über die Proteinkonzentration bestimmt. Dabei fiel die steigende spezifische Aktivität im Überstand mit steigender Löslichkeit der Trioseisomerase auf. Sie nimmt darin unter allen ausgemessenen Enzymen eine Sonderstellung ein. Dieser Anstieg läßt ähnlich wie beim Northrop-Test auf einen erheblichen Anteil Fremdprotein in der Präparation schließen. Diese Befunde werden in der Diskussion wieder aufgegriffen. (37)

Die Phosphoglyceratkinase.

Dieses Enzym ist aus Kaninchenmuskel noch nicht kristallin erhalten worden. Die höchste bisher erreichte spezifische Aktivität beträgt 350 I. E., sie wurde im Verlauf dieser Arbeit erreicht. Eine hier nicht abgebildete Löslichkeitskurve an einem amorphen Präparat von einer spezifischen Aktivität von 220 I. E. hatte den gleichen Verlauf wie die Löslichkeit der Trioseisomerase, von der sie auch bei der Präparation besonders schwer abzutrennen ist.

Die Laktatdehydrogenase.

Laktatdehydrogenase aus Kaninchenmuskel wurde zuerst von Czok und Bücher rein dargestellt. Das Protein kristallisiert in ähnlich feinen und schwer zu erkennenden Nadeln wie die Pyruvatkinase, sie werden bis $10\ \mu$ lang, ihre Querdimensionen bleiben aber unter der Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops. Nimmt man die Anwesenheit definierter Winkel als Kriterium eines Kristalls an, so ist also nicht gesichert, ob die Nadeln der Laktatdehydrogenase Kristalle in diesem Sinne sind.

Das Molekulargewicht beträgt 116 000. Im Kaninchenmuskel kommen verschiedene Proteine mit Laktatdehydrogenaseaktivität vor, sie entstehen durch Zusammenlagern von zwei verschiedenen Untereinheiten zu Viereraggregaten in allen denkbaren Kombinationen. Im Muskel überwiegt eine mit M bezeichnete Komponente. Der pH-Wert optimaler enzymatischer Aktivität ist 7,2; die Aktivität ist aber auffallend wenig vom pH abhängig. Das Molekül enthält gebundenes DPN (38, 39, 40).

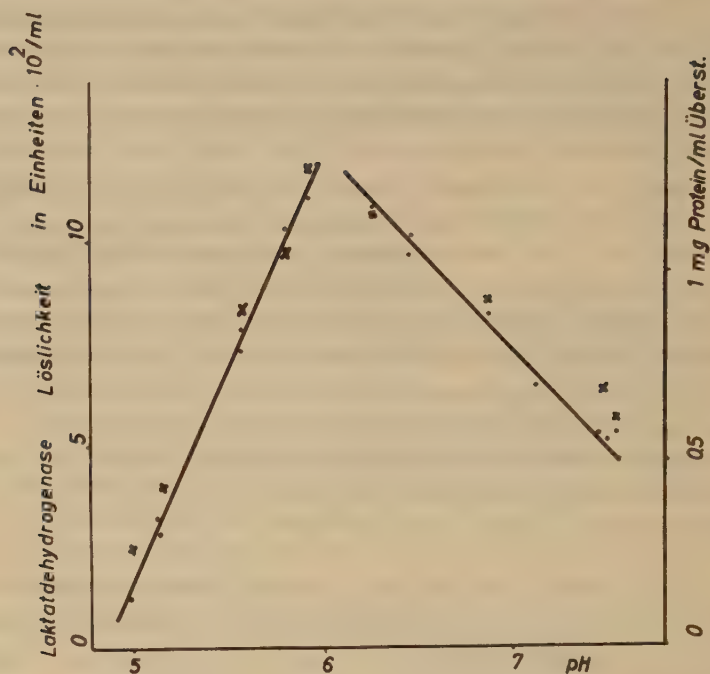
Die pH-Abhängigkeit der Löslichkeit der Laktatdehydrogenase.

Laktatdehydrogenase zeigte in 24 Stunden im pH-Bereich von 5,6 bis 9,5 keine merklichen Aktivitätsverluste. Das Abklingen der Aktivität bei höheren Wasserstoffionenkonzentrationen ist eine Reaktion erster Ordnung, während die Alkalidenaturierung nach anderem Mechanismus und angenähert nach der zweiten Reaktionsordnung verläuft.

Der pH-Gang der Löslichkeit wurde von pH 4,8 bis 7,5 gemessen, Abbildung 23 beschreibt die Ergebnisse, gewonnen mit einem Präparat von 530 I. E. pro mg Protein, eine spezifische Aktivität, die hier zum ersten Mal beschrieben wird. Der Kurventyp wird hier als Gerade interpretiert, doch läßt die Gesamtheit der aufgenommenen Kurven auch eine Deutung als sehr flachen exponentiellen Anstieg zu.

Die Löslichkeitskurven wurden bei einer Ammoniumsulfatkonzentration von 1,60 und 1,73 molar aufgenommen. Unter diesen Bedingungen ließ sich die zweite Kurve mit der ersten zur Deckung bringen, indem jede Löslichkeit mit dem Faktor 10 multipliziert wurde. Bei allen darauf untersuchten Proteinen ergab sich ebenso, daß sich mit veränderlicher Ionenstärke die Löslichkeit bei allen pH-Werten um den gleichen proteinspezifischen Faktor ändert.

Abbildung 23



Die pH-Abhängigkeit der Löslichkeit der Laktatdehydrogenase (LDH). In der linken Ordinate die enzymatische Aktivität im Überstand, in der rechten die Proteinkonzentration im Überstand. Kreuze = Aktivität, Punkte = Protein. Im Ansatz 8,4 mg Protein, spezifische Aktivität 528 I.E. /mg, Ammoniumsulfatmolarität 1,60

Die Glycerin-3-Aldehyd-3-Phosphatdehydrogenase.

Dieses Enzym ist sehr kristallisationsfreudig und wurde schon 1939 von Baranowsky aus Kaninchenmuskel kristallisiert. Die spezifische Aktivität sinkt im Verlauf der Präparation ab und kann durch Gluthathiongaben teilweise zurückgewonnen werden. Das Molekulargewicht beträgt etwa 117 000 bis 137 000. Das Molekül zerfällt in 5-molar Guanidiniumhydrochlorid in 4 Unter-einheiten vom Molekulargewicht 35 000. Das Molekül enthält 3 Mol dissoziationsfähiges NAD, es kann durch Gelfiltration abgetrennt werden. Der pH optimaler enzymatischer Aktivität liegt bei 8,7. Der isoelektrische Punkt verschiebt sich mit der Ionenstärke von pH 7,2 bis 5,9, wenn die Ionenstärke des zur Messung verwendeten Phosphatpuffers von 0,05 bis 0,20 ansteigt (41, 42, 43, 44, 45).

Die verwendete Glyceraldehydphosphatdehydrogenase wurde frisch aus Kaninchenmuskel kristallisiert und unter Gluthathionzusatz mehrmals umkristallisiert. Die spezifische Aktivität fiel dabei langsam ab, sie lag bei Aufnahme der ersten Löslichkeitskurve bei 406 I. E., und nach Abschluß der Messungen bei 85 I.E. Der erste Wert wird in dieser Höhe hier zum ersten mal mitgeteilt. Die Kristallisationseigenschaften werden von diesem Abfall nicht berührt.

Unterhalb von pH 5,5 entfärbt sich die sonst durch ihren Nucleotidgehalt gelb gefärbte Proteidlösung, der Umschlag ist reversibel und die Kristallisationsfähigkeit im alkalischen Bereich kehrt zurück. Bei noch stärker saurem pH sinkt die Löslichkeit ab und führt zu einer weißen Fällung, die zu kristallisieren mißlang, ohne denaturiert zu sein.

Die pH-Abhängigkeit der Löslichkeit der Glyceraldehydphosphatdehydrogenase.

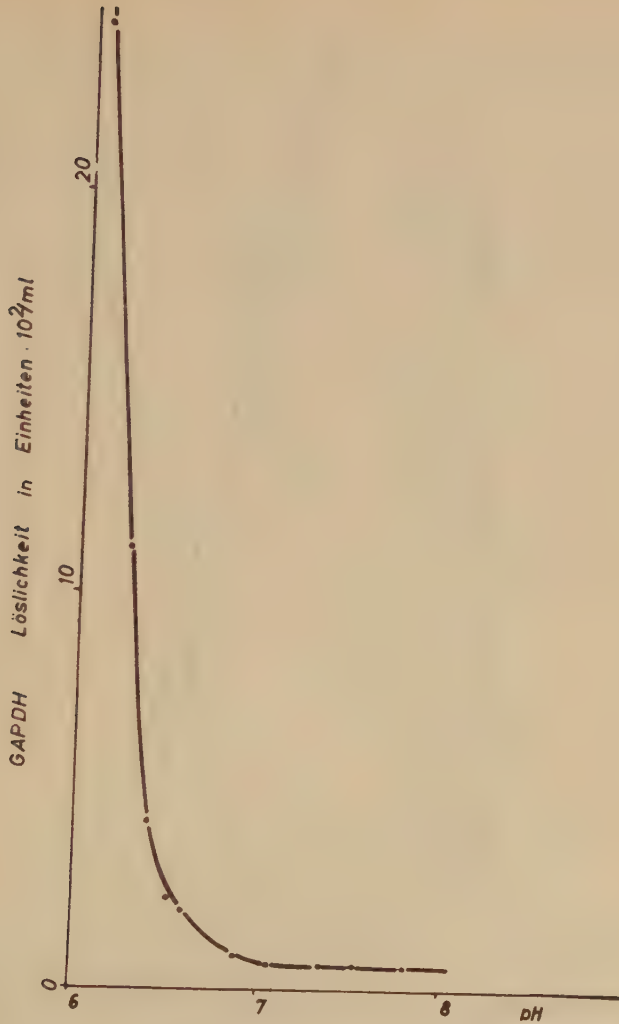
Die Glyceraldehydphosphatdehydrogenase wurde als Beispielenzym gewählt, um eine Beziehung zwischen Ionenart im Medium und pH-Funktion der Löslichkeit zu suchen. Da im Meßbereich puffernde Ionen im Medium in hoher Konzentration nicht zulässig sind und andererseits an der Enolase und vorliegendem Protein beobachtet wurde, daß die 1,1-wertigen Salze NaClO_4 , LiCl und Kaliumfor-

miat in gesättigter Lösung denaturierend wirkten, während mit gesättigten Lösungen von NH_4Cl und NH_4SCN die Löslichkeitsgrenze der Proteine nicht erreicht wurde, so wurde auf ein Gemisch aus Ammonsulfat und NaCl zurückgegriffen. Als ammon-sulfatärmstes Gemisch von ausreichender Fällungswirkung wurde eine Lösung von 2 Mol Ammonsulfat und 3 Mol NaCl im Liter gefunden. In Abbildung 26 ist das Ergebnis zusammen mit der Löslichkeit in reiner Ammoniumsulfatlösung in logarithmischem Maßstab aufgetragen.

Das Enzym wurde weiter als Modellprotein wegen seiner leichten Zugänglichkeit gewählt, um die Störmöglichkeit bei den Löslichkeitsmessungen durch eventuell im Laufe der Versuche ausfallendes denaturiertes Protein zu prüfen. Dazu wurde eine Reihe von Proben im pH-Bereich von 4,17 bis 8,85 gestaffelt ange-setzt wie zu einer Löslichkeitsmessung und dann 6 Stunden bei 70 Grad C belassen. In den Überständen wurde auf Protein und Aktivität geprüft und nichts gefunden. Demnach wird sich denaturiertes Eigenprotein nicht in der spezifischen Aktivität des Proteins im Überstand bemerkbar machen, solange genügend natives Protein im Sediment vorhanden ist. Die Abbildungen

24 und 25 zeigen eine in Ammonsulfat erhaltene Löslichkeitskurve in linearem und logarithmischem Ordinatenmaßstab und lassen die besondere Steilheit des Löslichkeitsanstiegs bei pH 6 erkennen.

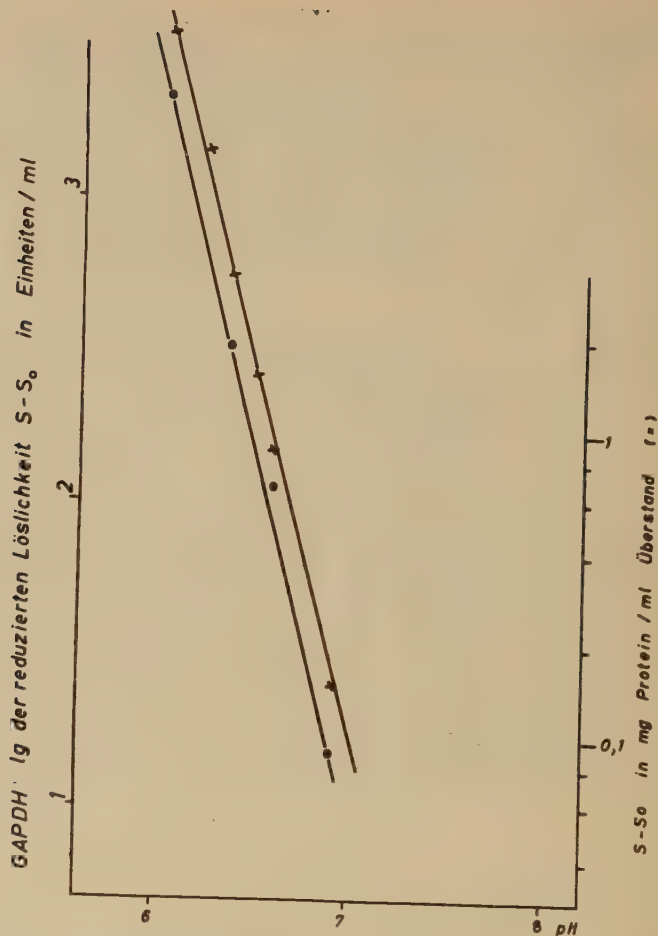
Abbildung 24



Die pH-Abhängigkeit der Löslichkeit der Glycerinaldehydphosphat-dehydrogenase (GAPDH).

Im Ansatz 34 mg Protein/ml mit einer spezifischen Aktivität 111 I.E.. Ammoniumsulfatmolarität 2,58.

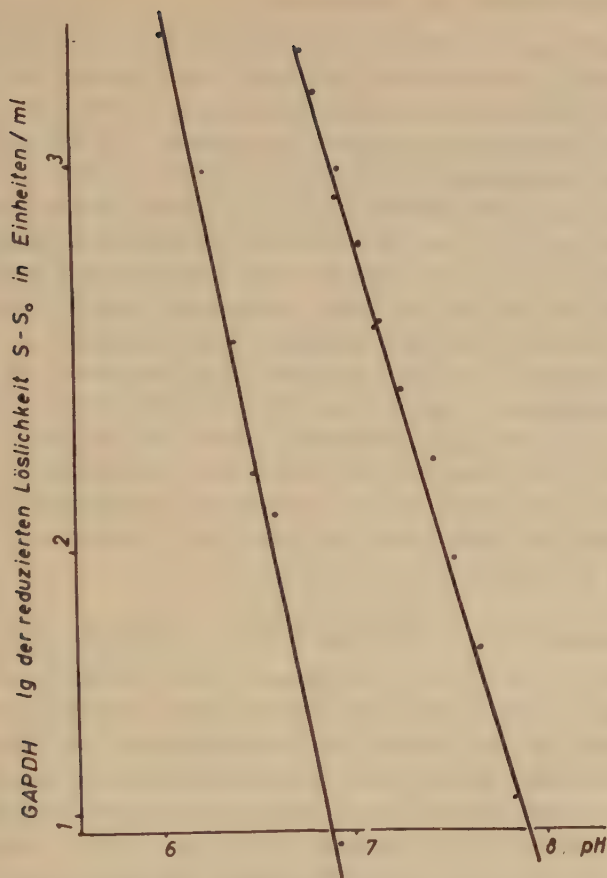
Abbildung 25



Die pH-Abhängigkeit der Löslichkeit der Glyceraldehydphosphat-dehydrogenase (GAPDH).

Gleicher Versuch wie in Abbildung 24. In den Ordinaten ist in logarithmischem Maßstab die Differenz zwischen der Löslichkeit beim jeweiligen pH-Wert minus der Löslichkeit S_0 im "Minimal-plateau" der Löslichkeit aufgetragen, links über die enzymatische Aktivität, rechts über die Proteinkonzentration im Überstand bestimmt.

Abbildung 26



Die pH-Abhängigkeit der Löslichkeit der Glyceraldehydphosphat-dehydrogenase in verschiedenem Ionenmilieu.

In beiden Versuchen das gleiche Enzympräparat mit einer spezifischen Aktivität von 111 I.E./mg Protein. In Versuch 1 22,4, in Versuch 2 33,0 mg Protein/ ml Suspension. In 1 2,0 molar Ammoniumsulfat und zusätzlich 2,95 molar NaCl. In Versuch 2 2,58 molar Ammoniumsulfat, in beiden Ansätzen zusätzlich 1 mg Äthylendiamintetraessigsäure / ml. In der Ordinate in logarithmischem Maßstab die Löslichkeit in den jeweiligen pH-Werten minus der Löslichkeit in den zugehörigen Minimalplateaus.

Die Malatdehydrogenase aus Pferdeherz.

Die Malatdehydrogenase ist im Gegensatz zu den bisher besprochenen Enzymen mitochondrialer Herkunft, das Protein aus Pferdeherz wurde zuerst von der Firma Boehringer kristallin dargestellt. Malatdehydrogenase aus Schweineherz ist ein gut untersuchtes Enzym, aus Pferdeherz aber nicht. Hier, wie bei der Beschreibung aller übrigen Proteine, wurde es nicht für zulässig erachtet, in den physikalisch-chemischen Eigenschaften von einem Protein einer Spezies auf das homologe Protein einer verwandten Art zu schließen. Betrachtet man die Löslichkeit, so ist es nicht einmal unbedenklich, Proteine aus verschiedenen Geweben einer Art einander gleichzusetzen, da im Sichelzellenhämoglobin ein Molekül bekannt ist, in dem sich der Ersatz einer einzigen Aminosäure durch eine andere in einer Löslichkeitsänderung von einer Größenordnung äußert, andererseits aber eine Reihe von Beispielen für molekulare Differenzen in den homologen Proteinen einer Art bekannt sind, zum Beispiel im β -Laktoglobulin der Milch (46, 47).

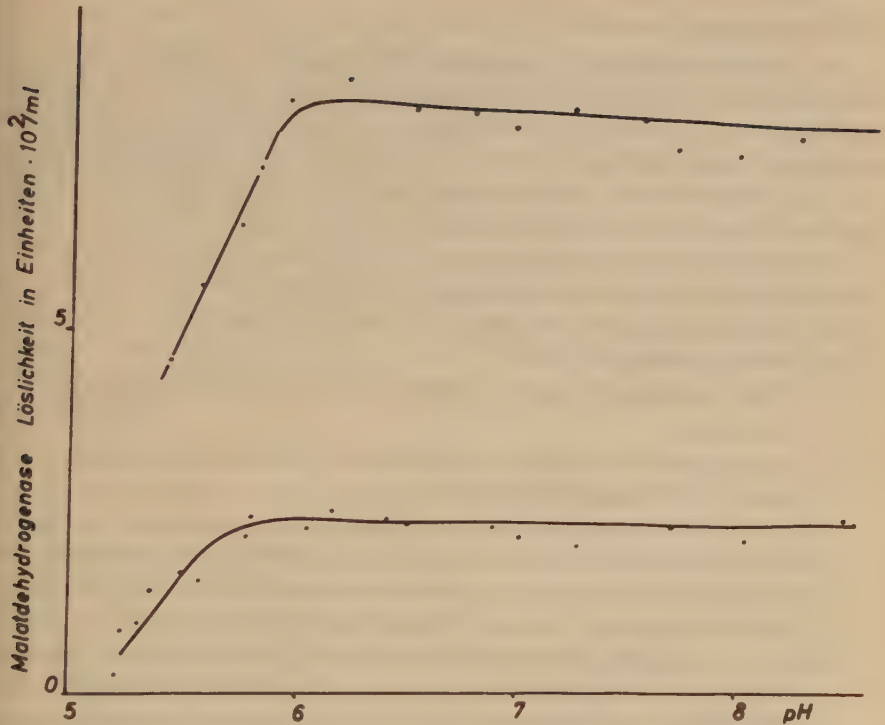
Die pH-Abhängigkeit der Löslichkeit der Malatdehydrogenase.

Die Löslichkeit der Malatdehydrogenase wurde von pH 5,2 bis 8,5 gemessen, oberhalb von pH 6 war sie vom pH-Wert unabhängig. Abbildung 27 stellt eine Löslichkeitskurve vor, gewonnen an einem Präparat mit einer spezifischen Aktivität von 720 I. E. - es war kristallin in dünnen Nadeln von maximal 15 μ Länge. Aus den aufgenommenen Kurven geht nicht eindeutig hervor, ob bei pH 5,9 ein Knickpunkt auftritt, wie er für die meisten der hier beschriebenen Proteine typisch ist, da ein solcher Knickpunkt in der Streuung der Meßwerte untergehen würde.

Die optische Aktivität der Malatdehydrogenase ist im Bereich ihrer Löslichkeitsänderung nicht pH-abhängig.

Auffällig ist eine Erniedrigung der Löslichkeit der Malatdehydrogenase mit steigender Temperatur.

Abbildung 27



Die pH-Abhängigkeit der Löslichkeit der Malatdehydrogenase. Im Ansatz 12,9 mg Protein/ ml mit einer spezifischen Aktivität von 720 I.E. / mg Protein. Ammoniumsulfatmolarität in der oberen Kurve 2,69 in der unteren 3,00. Es ist auch die Interpretation mit einem Knickpunkt bei pH 5,8 bis 5,9 möglich, eine Entscheidung ist jedoch nicht gelungen.

Diskussion

Vereinfachende Annahmen:

Aus skandinavischen [Sörensen, Linderström-Lang, 48 , 49] und amerikanischen Schulen [Scatchard, Northrop, Cohn] existieren in der Literatur einige sorgfältige experimentelle und theoretische Untersuchungen über die Variation der Proteinlöslichkeit mit der Wasserstoffionenkonzentration. Unter den experimentellen Arbeiten sind besonders diejenigen von A.A. Green [7] am Carboxyhämoglobin im Aussalzbereich und die von Gronvall [50] am β -Lactoglobulin im Einsalzbereich anzuführen.

Die theoretischen Überlegungen gehen von einer Reihe idealisierender Voraussetzungen aus:

1. Die Proteinlöslichkeit wird als Gleichgewichtskonstante betrachtet.
2. Der Dispersionsgrad des gelösten Proteins ändert sich nicht in dem betrachteten Bereich.
3. Die Konzentration des Neutralsalzes ist konstant und so groß, daß Änderungen des Aktivitätskoeffizienten wie auch Änderungen der Konstanten der Wechselwirkungen zwischen Salzionen und Protein vernachlässigt werden können.
4. Das chemische Potential des kristallinen Proteins ist konstant, d.h. die Zusammensetzung der Proteinmoleküle im Bodenkörper ändert sich nicht mit der Wasserstoffionenkonzentration.

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse erweitern das bislang über den Aussalzbereich vorliegende Material. Insbesondere wird das Auftreten von Knickpunkten in der pH-Löslichkeitskurve einer Reihe von Proteinen erstmals eingehender dargestellt.

Obwohl dieses verbreitete Phänomen den Voruntersuchern entgangen zu sein scheint, halte ich es für nützlich, von ihren Ableitungen auszugehen und ihre Voraussetzungen zu prüfen.

Die Argumente zugunsten dieser vereinfachenden Annahmen seien nachstehend kurz zusammengefasst.

Zu 1 : Die Gültigkeit der Phasenregel für das System Proteinklösung und kristalliner Bodenkörper im Aussalzbereich ist insbesondere von den Schulen Northrops und Edsalls eingehender untersucht worden [14, 37]. Auf dieser Grundlage sind eine Reihe von Reinheitstests entwickelt worden, deren Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit als erwiesen gilt [51, 52]. Wie ich am Beispiel des Enolaseproteins gezeigt habe, ist für die experimentelle Problematik in erster Linie das Gegeneinanderspielen folgender Prozesse maßgebend: Der Denaturierung der Proteinmoleküle [in Abhängigkeit von Ionenstärke und Wasserstoffionenkonzentration] und der Verschiebung der Phasengleichgewichte. Theoretisch gibt es im System nur Fließgleichgewichte. Praktisch sind jedoch in einem gewissen Bereich der H-Ionenkonzentration die Zeitkonstanten der obengenannten Prozesse so weit verschieden, daß der statische Zustand genügend weitgehend angenähert werden kann, um die Proteinlöslichkeit als Gleichgewichtskonstante zu betrachten.

Zu 2 : Diese Annahme ist einigermaßen der direkten experimentellen Prüfung zugänglich. Abbildung 31 gibt ein Beispiel. Sie zeigt insbesondere für das hier näher zur Diskussion herangezogene Enolaseprotein die Unabhängigkeit des Dispersionsgrades von Ionenstärke und Wasserstoffionenkonzentration. Die in einer früheren Mitteilung [53] behauptete Dissoziation des Enolaseproteins in zwei Untereinheiten in konzentrierteren Ammoniumsulfatlösungen kann ich nicht bestätigen.

Zu 3 : Diese Annahme dürfte vor allem für Untersuchungen im sog. Einsalzbereich kritisch sein, während die vorliegenden Untersuchungen bei sehr hoher Neutralsalzkonzentration im sog. Aussalzbereich durchgeführt wurden.

Zu 4 : Die vierte Voraussetzung ist die kritischste - sowohl was die Möglichkeit betrifft, übersehbare Ableitungen zu finden, als auch im Hinblick auf die Neigung des Lesers, sie zu akzeptieren: Bezeichnen wir die Zahl der prototropen Gruppen eines Proteinmoleküls mit n , dann existieren nicht nur n Gleichgewichte der Protonendissoziation, sondern darüber hinaus $n + 1$ Gleichgewichte der Wechselwirkung jeder Ladungsform mit dem Salzmilieu. Für jeden dieser thermodynamisch definierten Zustände gilt weiterhin

auf der Ebene molekularer Interpretation, daß i vom Protein gebundene Protonen auf verschiedene Stelle in $n! / i! [n-i]!$ verschiedener Weise verteilt sein können. Um ein Beispiel zu zitieren, das Linderström-Lang gegeben hat (48). Für isoelektrisches Hämoglobin, in dem 12 von 33 Histidinreste ein Proton verloren haben, entspricht

$$\frac{33!}{21! \cdot 12!} = 354\ 817\ 320 \quad 2$$

verschiedenen Formen. Einerseits wird die Verteilung sehr rasch fluktuieren, andererseits könnte das chemische Potential bestimmter Verteilungszustände sehr verschieden voneinander sein. Die genannte Voraussetzung kann daher nicht dahingehend ausgelegt werden, daß im Bodenkörper nur eine dieser Vielfalt von Formmöglichkeiten vertreten ist, wie sie sich auf der Ebene molekularer Interpretation darstellen.

Cohn und seine Schule, besonders A.A. Green (7) haben bei der Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Neutralsalzwirkung auf die Löslichkeit einer Reihe von Proteinen - besonders Carboxyhämoglobin - folgende Regel entdeckt: Die Interceptkonstante β (vgl. Gleichung 1, Seite 3) ist eine Funktion der Wasserstoffionenkonzentration, die Aussalzkonstante K ist dagegen pH-unabhängig. Cohns Regel trifft auch auf die hier eingehender untersuchten Proteine Enolase und Lactatdehydrogenase zu (Tabelle S.7). Bemerkenswerterweise wird die Neutralsalzwirkung hier durch zwei Aussalzkonstanten charakterisiert, entsprechend den zwei Ästen der pH-Löslichkeitskurve beiderseits des Knickpunktes.

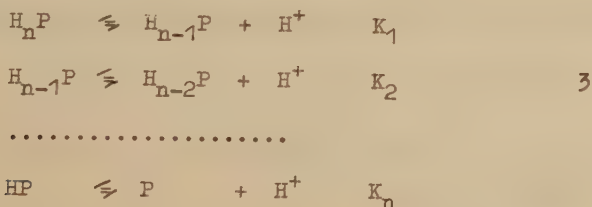
Setzen wir voraus, daß für die Neutralsalzwirkung auf die Löslichkeit nur jene Species des Proteins maßgebend sind, die in der Lösung und im Bodenkörper zugleich auftreten, dann ist die Unabhängigkeit der Aussalzkonstante - auf der Ebene thermodynamischer Interpretation - ein Argument für die Brauchbarkeit von Voraussetzung 4.

Ein weiteres Argument auf thermodynamischer Ebene für die Brauchbarkeit von Voraussetzung 4 sind die Knickpunkte in den pH-Löslichkeitskurven einiger Proteine, die wir beschrieben haben. In den Systemen, in denen sie auftreten, sollten in diesen Punkten (und nur in diesen Punkten) zwei thermodynamisch exakt definierte Bodenkörper nebeneinander existent sein. Mit der Beschreibung dieser Knickpunkte ist ein zweites, von Cohns Regel unabhängiges Argument für die Brauchbarkeit der ersten Annahme gegeben.

Säure-Basen-Gleichgewichte:

1925 hat Leonor Michaelis das Massenwirkungsgesetz auf die Frage angewandt, wie sich die Löslichkeit eines schwachen Elektrolyten während der Dissoziation ändert. Sano hat im Jahr darauf die Brauchbarkeit dieser Vorstellungen anhand der Löslichkeit von Aminosäuren bestätigt. Bereits 1931 hat A.A. Green in den bereits genannten Untersuchungen über die Löslichkeit des Kohlenoxyd-Pferde-Hämoglobins die Überlegungen von Michaelis auf das Problem der Löslichkeit von Proteinen anzuwenden. Die vereinfachenden Voraussetzungen dieser Überlegungen sind bereits eingangs der Diskussion angeführt worden. Die charakteristische Annahme (4) ist, daß nur eine Species definierter Ladungssumme und mit definiertem Ladungsüberschuß des gelösten Proteins *d i r e k t* im Lösungsgleichgewicht mit dem Bodenkörper steht [53, 54].

Die Säure-Basen-Gleichgewichte eines Proteins, welches bei voller Protonierung insgesamt n Säuregruppen (ungeladene und Kation-Säuren) enthält, können durch folgende Dissoziationsgleichgewichte beschrieben werden:

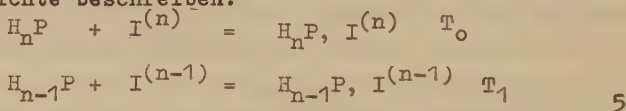


Darin ist H_nP die vollprotonierte Form des Proteins. $K_1, K_2 \dots K_n$ sind die thermodynamischen Säure-Dissoziationskonstanten

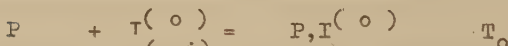
$$K_i = \frac{a_H \cdot m_{n-i} \cdot \gamma_{n-i}}{m_{n-i+1} \cdot \gamma_{n-i+1}} \quad 4$$

m_{n-i} ist die Konzentration und γ_{n-i} der Aktivitätskoeffizient von $H_{n-i}P$. Wie bereits eingangs der Diskussion erwähnt, ist m_{n-i} die Summe einer großen Zahl verschiedener molekularer Species, die alle die gleiche Ladungssumme tragen.

Allgemein bindet das Protein auch noch andere als H-Ionen, wie auch andere Partner der Lösung und wir können, Linderström-Lang und Nielson [48] folgend, den Einfluß dieser Bindungen auf die Dissoziationsgleichgewichte durch $n+1$ zusammengesetzte Gleichgewichte beschreiben:



.....



Darin repräsentiert $I^{(n-i)}$ alle Ionen und Partner - außer Wasserstoffionen -, die von der Proteinspecies $H_{n-i}P$ "gebunden"

$$T_i = \frac{m'_{n-i}}{m_{n-i}} \quad 6$$

werden. $m'_{n-i} + m_{n-i}$ ist die gesamte Konzentration der Proteinmoleküle mit $n-i$ gebundenen Protonen. $T_0, T_1 \dots T_n$ sind Funktionen der Zusammensetzung des Mediums. Sie verschwinden alle, wenn das Protein nur mit Protonen kombiniert.

Bezeichnen wir die gesamte Konzentration des Proteins mit m

$$\sum_{i=0}^n (m'_{n-i} + m_{n-i}) = \sum_{i=0}^n (1 + T_i) m_{n-i} = m \quad 7$$

dann haben die $n+1$ Gleichungen mit den Unbekannten $m_0, m_1 \dots m_n$ folgende Lösungen:

$$m_q = D_q / D$$

$$D_q = m_t a_H^q \frac{\gamma_0}{\gamma_q K_n K_{n-1} \dots K_{n-q+1}} = m_t a_H^q \frac{\gamma_0}{\gamma_q} \prod_{j=1}^q K_{n-j+1}^{-1} \quad 8$$

$$D = \prod_{i=0}^i (1 + \tau_{n-1}) a_H^i \frac{\gamma_0}{\gamma_i} \prod_{j=1}^i K_{n-j+1}^{-1} \quad K_{n+1} \equiv 1$$

Definieren wir die mittlere Wasserstoffionen-Ionisation $\bar{n}$ als die mittlere Zahl von Protonen pro Molekül, die vom vollprotonierten Protein dissoziiert sind, dann ist

$$\bar{n} = \frac{1}{m_t} \sum_{q=0}^{q=n} n_q (m_q' + m_q) = \frac{1}{m_t} \sum_{q=0}^{q=n} (n-q)(1 + \tau_{n-q}) m_q \quad 9$$

diese Gleichung kann formell geschrieben werden

$$\bar{n} = n - \frac{d \ln D}{d \ln a_H} \quad 10$$

wobei in der Differentiation nur der Wasserstoffionen-Aktivität erlaubt wird, sich zu ändern.

Um nunmehr zum Problem der Löslichkeit überzugehen, nehmen wir an H_nP sei die Species des Proteins, deren Konzentration m_r in der gesättigten Lösung konstant bleibt. Es folgt dann für die Konzentration des Gesamtproteins nach 8

$$m_t = D m_r / \frac{D_r}{m_t} \quad 11$$

und andererseits für die Abhängigkeit der Löslichkeit von der Wasserstoffionenkonzentration

$$\frac{\lg S}{p_H} = \left(\frac{d \lg m_t}{d p_H} \right) m_r = - \left(\frac{d \ln m_t}{d \ln a_H} \right) m_r \quad 12$$

da m_r voraussetzungsgemäß als konstant angenommen wird, ist

$$-\left(\frac{d \ln m_t}{d \ln a_H}\right)_{m_r} = -\left(\frac{d \ln D}{d \ln a_H}\right)_{m_r} + r$$

13

und damit

$$d \lg S / d \text{pH} = \bar{n} - (n-r)$$

14

$\bar{n}$ - r und $\bar{n}$ sind die mittleren Wasserstoffionisationen im Kristall und in der Lösung.

Aus Beziehung (1) ergibt sich ein Minimum der Löslichkeitskurve unter der Bedingung $\bar{n} = n - r$. Der Anstieg der Löslichkeitskurve auf beiden Seiten des Minimums ergibt sich aus der Beziehung zwischen $\bar{n}$ und pH, die man der Titrationskurve im gleichen Medium entnimmt. Hat beispielsweise die Titrationskurve in der Umgebung des Minimums eine konstante Steigung a , so ist die Löslichkeitskurve des Proteins in der Umgebung des Löslichkeitsminimum eine Parabel.

$$d \lg S / d \text{pH} = a (\text{pH} - \text{pH}_0)$$

15

$$\text{Lg } S/S_0 = 1/2 a (\text{pH} - \text{pH}_0)^2$$

16

S_0 und pH_0 bedeuten dabei die Proteinlöslichkeiten und das pH des Minimums.

Ein gewisser Erfolg dieser Beziehung liegt darin, daß sie uns hilft, das oftmals außerordentliche Ausmaß der Abhängigkeit der Proteinlöslichkeit von der Wasserstoffionenkonzentration zumindest qualitativ zu verstehen.

Hinsichtlich des Bemühens um ein Verständnis der Proteinlöslichkeit wollen wir zunächst die theoretischen Bemühungen um die Titrationskurve der Proteine weiter verfolgen. Die Berechnung dieser Titrationskurven aus Aminosäurezusammensetzung und Konformation unter Berücksichtigung der elektrischen Eigenschaften des Lösungsmittels ist heute noch außerhalb der Reichweite der Theorie. Die Versuche um die Theorie der Protonengleichgewichte haben sich daher auf den Entwurf von Modellen gerichtet, deren Eigenschaften man als bekannt annimmt. In ihren Konsequenzen soll dann die die experimentell ermittelte Titrationskurve folgen.

Ich werde hier das einfachste Modell heranziehen, das sogenannte smeared site-Modell von Linderström-Lang. In diesem Modell wird angenommen, daß eine Kugel niederer Dielektrizitätskonstante das Proteinmolekül repräsentiert und daß die pH-abhängige Überschußladung gleichmäßig über die Proteinoberfläche "verschmiert" ist. Die Kugel ist nun in ein Lösungsmittel von der Dielektrizitätskonstante des Wassers eingetaucht. Die elektrische Energie einer solchen Kugel mit der Ladung h und dem Radius b ist gleich

$$E = \frac{h^2 e^2}{2 b D_0} \quad n \quad 17$$

mit e = Elementarladung
 D_0 = Dielektrizitätskonstante des Wassers.

Mit $h = n - i$ werden dann die effektiven Dissoziationskonstanten

$$K_{n-i} = \frac{i + 1}{n - i} K^! e^{-w_0 ((n-i)^2 - (n-i-1)^2)} \quad 18$$

wobei $w_0 = \frac{e^2}{2 k T D_0 b}$ ist.

Die Überlegung gilt für die Ionenstärke 0 und, wie das Auftreten von nur einem Wert $K^!$ zeigt, nur einen Typ prototroper Gruppen. Setzt man die K_{n-1} -Werte der Gleichung o in Gleichung g ein, so ergibt sich die Möglichkeit zu einer angenäherten Lösung von praktischem Nutzen:

$$pH = pK^! + \lg_x \frac{\bar{h}}{n - \bar{h}} + 0,868 w_0 \bar{h} \quad 19$$

Mit sinnvoll gewählten $K^!$ -Werten hat man an typischen Beispielen die $\bar{h}$ -Werte berechnet und mit den aus der Titrationskurve entnommenen experimentellen Werten verglichen, wobei die Abweichungen über den gesamten Bereich der Titration 0,1 Mol H^+ / Mol Protein nicht überstiegen. Das gibt dem "smeared site"-Modell ein Gewicht, das seine Gültigkeit auch bei der Behandlung der pH-Abhängigkeit der Proteinlöslichkeit nahelegt. In molekularer Deutung gesehen ist das gleich der Annahme, daß die Fluktuationen der Ladung zwischen den im Dissoziationsgleichgewicht stehenden Gruppen rasch sind gegen die Bewegungen, die beim Lösungsvorgang das Proteinmolekül aus dem Gitterverband lösen oder es ihm einfügen. Weiter

sollte die Zahl der prototropen Gruppen nicht zu klein sein.

Anwendung der Theorie auf Löslichkeit und Protonengleichgewichte der Enolase.

Zur Prüfung der oben dargelegten Beziehungen ist besonders Gleichung (1) geeignet. In ihr ist der dem Experiment zugängliche Anstieg der Löslichkeit mit dem pH-Wert korreliert mit der Zahl der Protonen pro Molekül, die beim zugehörigen pH-Wert vom Protein im Überstand abgegeben oder aufgenommen wurden, verglichen mit der Zahl im Sediment, die identisch ist mit der Zahl im Überstand beim pH minimaler Löslichkeit. Die gleichen h-Werte sind aber auch der Titrationskurve entnehmbar, wenn sie unter gleichen Ionenbedingungen aufgenommen wurde wie die Löslichkeitskurve. Die Tabelle zeigt einmal die h-Werte aus der Löslichkeitskurve, bezogen auf ein Löslichkeitsminimum bei pH 4,3 und 6,9 daneben die h-Werte aus der Titration, ausgeführt bei zwei verschiedenen Ionenstärken.

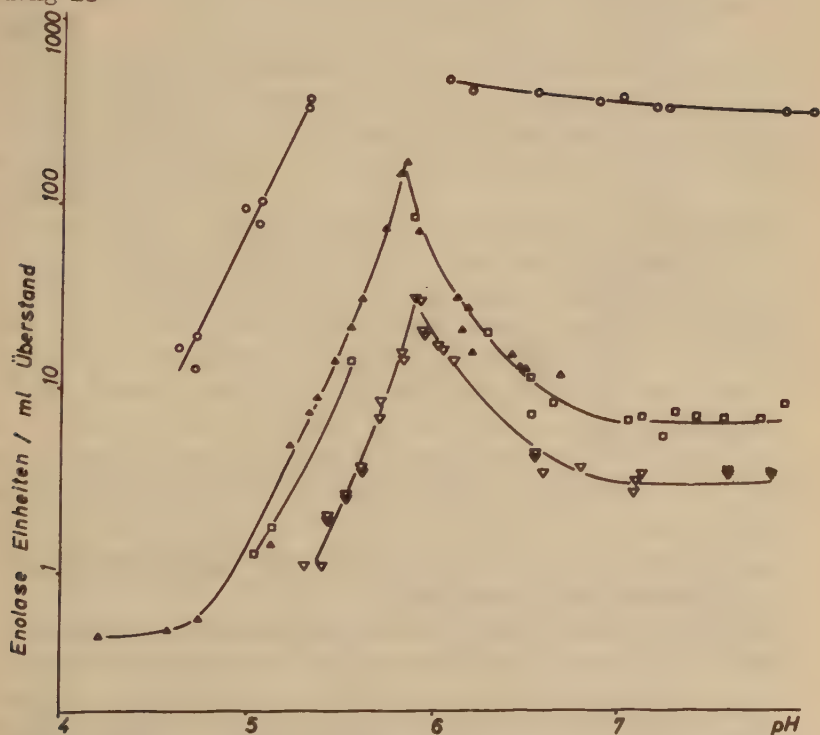
Ammoniumsulfatmolarität 1,43

pH	d lgS/d pH	$\bar{h} - \bar{h}_{pH\ 6,9}$	$\bar{h} - \bar{h}_{4,3}$
4,3	0,1		0
4,5	0,3		2,5
4,7	0,6		4,6
4,9	1,4		6,4
5,1	2,0		8,2
5,2	2,0		8,9
5,4	2,0		10,3
5,6	2,0		11,8
5,8	2,0		12,8
6,0	- 1,4	2,5	
6,2	- 1,25	1,6	
6,4	- 0,8	1,4	
6,6	- 0,3	0,9	
6,9	0	0	

Ammoniumsulfatmolarität 3,79

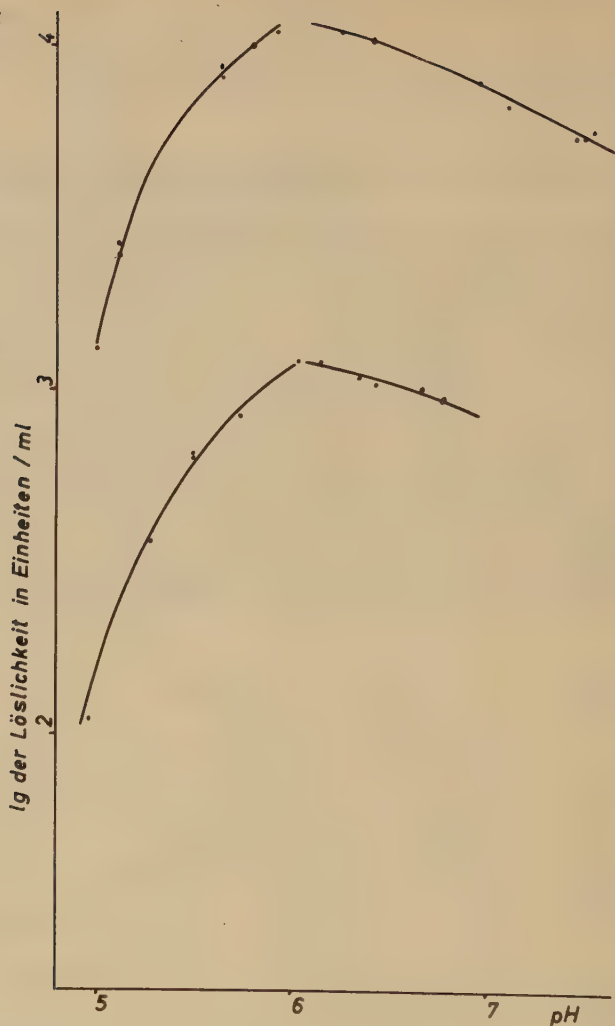
pH	d lg S/d pH	$\bar{n} - \bar{n}_{pH\ 6,9}$	$\bar{n} - \bar{n}_{pH\ 4,3}$
4,3			0
4,5			3,1
4,7			5,3
4,9			7,6
5,1			9,4
5,2			10,5
5,4			12,0
5,6			13,5
5,8			14,5
6,0	2,5		
6,2	1,6		
6,4	1,4		
6,6	0,9		
6,9	0		

Abbildung 28



Die pH-Abhängigkeit der Löslichkeit der Enolase bei verschiedenen Ammoniumkonzentrationen in logarithmischer Auftragung. Ammoniumsulfatmolarität von oben nach unten 2,39, 2,70, 3,00.

Abbildung
29



Die pH-Abhängigkeit der Löslichkeit der Lactatdehydrogenase in logarithmischer Auftragung.

Auch in diesem Fall einer nicht logarithmischen Beziehung werden die Kurven durch Änderung der Ionenstärke nur linear in der Ordinatenrichtung verschoben. [Obere Kurve in 1,56 molar, untere in 1,74 molar Ammoniumsulfat] Daraus folgt, daß nicht K , sondern lediglich β aus Cohns Gleichung mit der Wasserstoffionenkonzentration veränderlich ist.

Die Tabelle zeigt, daß die Überlegungen von Linderström-Lang nicht auf die Enolase anwendbar sind, und sie zeigt weiter einen Grund dafür auf: Die Titration in 3,79 molar Ammoniumsulfat war eine Titration in festem Zustand, da bei dieser Salzkonzentration das Protein im zugänglichen pH-Bereich praktisch vollständig unlöslich ist, im aufgeführten Versuch lag es als Kristallsuspension vor. Die Titration im festen Zustand ergab also ähnliche h-Werte wie im Überstand. Eine volle Übereinstimmung war nicht zu erwarten, da die bei niedrigerer Salzkonzentration höhere elektrostatische Wechselwirkung Unterschiede erwarten ließ. Die Richtung der Unterschiede im Experiment ist die erwartete: Die spezifische Pufferkapazität des Proteins ist bei höheren Ionenstärken in der Nähe von $p_K^1 = pH$ erhöht, weiter davon entfernt erniedrigt. Die Basisdissoziationskonstante K^1 , die das Bild beherrscht, ist den Carboxylgruppen des Proteins zuzuordnen.

In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, daß bei gleicher Ionenstärke volle Übereinstimmung in den h-Werten von Überstand und Sediment besteht. Die Versuche nützen aus, daß sich die Protonengleichgewichte um ein vielfaches rascher einstellen als das Lösungsgleichgewicht.

In einem ersten Versuch wurde die Ionenstärke so eingestellt, daß bei pH 7 das Protein weitgehend im Sediment vorliegt, bei pH 5,8 aber völlig im Überstand. Dann wurde so langsam von pH 7 nach pH 5,8 titriert, daß auch die Bedingung ständigen Lösungsgleichgewichtes angenähert erfüllt war, am Endpunkt resultierte eine klare Lösung. Anschließend wurde nach pH 7 zurücktitriert. Bei der Rücktitration herrschte durchaus kein Lösungsgleichgewicht, da das Protein in übersättigter Lösung stabil blieb. Pufferkapazität auf Hin- und Rückweg erwiesen sich als gleich. Das erlaubt den Schluß, daß Zahl und pK -Werte der prototropen Gruppen in Überstand und Sediment gleich sind. Auch wenn man den pH-Wert rasch von der Bedingung weitgehender Unlöslichkeit zu denen völliger Löslichkeit umstellt, so ändert sich der pH-Wert der Lösung nicht, wenn das Protein vom Sediment in den Überstand tritt.

Die anfangs erwähnte Annahme, die chemische Zusammensetzung des Proteins im Bodenkörper sei nicht pH-abhängig, ist für die Enolase nicht anwendbar.

Da durch diese Befunde die Überlegungen von Linderström-Lang und die älteren Überlegungen von A.A. Green (7) nicht mehr auf die pH-Abhängigkeit der Löslichkeit der Enolase anwendbar geworden sind, wurde durch eine neue Arbeitshypothese die pH-Abhängigkeit des Dipolmoments der Proteine ins Spiel gebracht. Vom Dipolmoment der Proteine ist zu erwarten, daß es in den extremen pH-Bereichen, in denen das Protein nicht als Zwitterion vorliegt, gering ist und in mittlerem Dissoziationszustand ein Maximum durchläuft. Auch hier sollte das smeared-site-Modell Anwendung finden. Danach sind Vektorrichtung und Größe des Dipolmoments vom Mikrozustand der Landungsverteilung abhängig, für die Lösungsbewegungen dagegen ist nur ein mittleres Dipolmoment wirksam, dessen Richtung vom Muster der Landungsorte auf der Proteinoberfläche abhängt.

Nun kann ein Makromolekül vom Typ der Proteine nur löslich sein wenn es hydratisiert ist, und es wird umso stärker hydratisiert sein, je größer das Dipolmoment ist. Im Aussalzbereich, wo Konkurrenz um das Hydratwasser besteht zwischen den Ionen des zugefügten Salzes und dem Protein, ist mit einem Ansteigen der Löslichkeit mit Ansteigen des Dipolmomentes zu rechnen. Es ergab sich, daß diese Arbeitshypothese prüfbar ist durch Betrachtung der Abhängigkeit der Löslichkeit von der Ionenstärke. Wir müssen uns dazu den Gedankengängen von Debye und Aulay anschließen, die 1924 eine Theorie der Aussalzung von Nichtelektrolyten vorgelegt haben. Sie verknüpft die Löslichkeitsänderungen mit der Änderung der Dielektrizitätskonstanten der gemeinsamen Lösung von Elektrolyt und Nichtelektrolyt.

Die Theorie der Aussalzung von Debye und Aulay.

Wie eingangs erwähnt, werden die Neutralsalzwirkungen auf die Löslichkeit von Proteinen bei hoher Ionenstärke [Cohns Formel , 55] und auf die Löslichkeit typischer Nichtelektrolyte [Setschenows Formel, 3] durch Beziehungen von gleicher Form beschrieben:

mit S = Löslichkeit

$$\ln S = B - K \cdot C$$

C = Elektrolytkonzentration

B und K sind Konstanten.

Daher darf angenommen werden, daß für beide Stoffklassen die Wirkung des Elektrolyten auf seinen Lösungsgenossen gleiche Ursache hat. Es handelt sich nach Überlegungen von P. Debye und Mc. Aulay

(6) um die Arbeit, welche die Vermehrung der elektrischen Energie des Ionenfeldes der Salzionen beansprucht, falls die Mischung des Wassers mit dem Lösungsgenossen mit einer Änderung der Dielektrizitätskonstante verknüpft ist.

Für Lösungen von Gasen, Rohrzucker und allgemein von Nicht-elektrolyten ist die "Interceptkonstante" S die Löslichkeit des Stoffes in reinem Wasser, bei Proteinen hat sie diese Bedeutung nicht. Vielmehr erhöht bei niederen Ionenstärken (im "Einsalzbereich") das Neutralsalz die Proteinlöslichkeit, auch in Gegenwart proteinfällender, mit Wasser mischbarer organischer Lösungsmittel.

Offenbar ist das Protein bei niederen Ionenstärken in einem ganz anderen Zustand als bei hohen. Im ersten Fall sind die Festionen an der Oberfläche der Makromoleküle kaum durch eine Gegenionenhülle abgeschirmt und heteropolare Wechselwirkung dürfte die Löslichkeit begrenzen. Im zweiten Fall sind die polaren Gruppen der Proteine auf engstem Raum abgeschirmt und das unpolare Innere beherrscht die Löslichkeit.

In dieser Untersuchung wurden Neutralsalzkonzentrationen zwischen 1,6 und 3,6 molar angewandt. Wie bereits Czok und Bücher (2) gezeigt haben, wird das Löslichkeitsverhalten der von uns untersuchten Proteine des Kaninchenmuskels in diesem Bereich durch Cohns Gleichung einigermaßen befriedigend beschrieben. Abb. 30 gibt als Beispiel das Enolaseprotein bei verschiedenen pH-Werten.

Die Steigung der Löslichkeitskurven einiger Proteine in logarithmischer Auftragung der "reduzierten Löslichkeit"

Enzym	$d \lg [S - S_0] / d pH$
Enolase, in Ammoniumsulfat pH 5,0 - 5,9	2,5
Enolase, in Ammoniumsulfat pH 5,9 - 6,5	2,5
Enolase, in NaCl und Ammoniumsulfat pH 5,0 - 5,7	3,6
Glyceraldehydphosphatdehydrogenase in Ammoniumsulfat	3,3
Glyceraldehydphosphatdehydrogenase in Ammoniumsulfat und NaCl	1,8
Trioseisomerase, in Ammoniumsulfat pH 4,8 - 5,8	1,4

Über den Status des Proteinmoleküls im Aussalzbereich und im Bodenkörper haben wir heute aufgrund der Röntgenstrukturanalysen kristallisierter Hämproteide [15, 16, 17, 18] und des Lysozyms (56, 57) wesentlich klarere Vorstellungen, als noch vor wenigen Jahren denkbar. Wie in der Lösung ist das Protein auch im Kristall mit einer mehrere Moleküllagen dicken Hydratwasserhülle umgeben. Im allgemeinen sind diese Wassermoleküle röntgenographisch nicht darstellbar. Dagegen sind einige wenige Wassermoleküle innerhalb des Proteinmoleküls genügend geordnet, um kristallographisch erfaßbar zu sein. Die fast ausschließlich im Oberflächenbereich lokalisierten Reste polarer Aminosäuren sind durch den im Kristall in hoher Konzentration anwesenden, ebenfalls nicht darstellbaren Elektrolyten abgeschirmt. Die Unterschiede zwischen den Proteinmolekülen in der Lösung und innerhalb des Bodenkörpers sind gering, und die zwischenmolekularen Kräfte, nicht zuletzt auch wegen der globulären Form der Gitterbausteine, klein.

Nach dem allgemeinen Vorgehen der Debye'schen Ansätze für Zustandsgleichungen starker Elektrolyte ergibt sich aus der obengenannten, durch den Lösungsgenossen des Neutralsalzes verursachten Zusatzarbeit der natürliche Logarithmus des Aktivitätskoeffizienten des Lösungsgenossen in erster Näherung zu:

$$\ln f = \frac{e^2}{2 D_0 r k T} c \cdot a \sum v_i z_i^2 \quad 20$$

Er ist proportional dem Verhältnis der elektrischen Energie des mittleren Ions (mit dem Radius r) $e^2 / 2 D_0 r$ zur thermischen Energie kT , proportional der Konzentration c des Neutralsalzes sowie seines Wertigkeitsfaktors $\sum v_i z_i^2$ (v_i Ionen der Ladung z_i) und schließlich proportional einer Konstante a , welche misst, wie stark die Dielektrizitätskonstante (D) der Lösung durch den Zusatz des Lösungsgenossen verändert wird. Bezeichnen wir die Konzentration des Lösungsgenossen mit c' , ferner die Dielektrizitätskonstante der Lösung mit D_0 , dann sei die Konstante a gemäß folgendem Ansatz erhältlich gedacht:

$$D = D_0 (1 - a c') \quad 21$$

Definitionsgemäß ist der Aktivitätskoeffizient f der Faktor, mit dem die tatsächliche Konzentration in einer Gleichgewichtsproportion zu multiplizieren ist, um die wirksame Konzentration oder Aktivität zu erhalten.

Obenstehender Ansatz zeigt demnach, daß durch einen Elektrolytzusatz die Aktivität des Nichtelektrolyten in erster Näherung proportional der Zahl der zugesetzten Ionen vermehrt wird, solange a positiv ist, d.h. falls nach (3) der Zusatz des Nichtelektrolyten zum Lösungsmittel eine Verminderung der Dielektrizitätskonstanten bewirkt.

Da aber für das Lösungsgleichgewicht mit dem Bodenkörper die Aktivität maßgebend ist, hat die Erhöhung der Aktivität die Bedeutung, daß schon eine kleinere Konzentration ausreicht, um das Lösungsgleichgewicht zu unterhalten, und das heißt, daß der Lösungsgenosse des Neutralsalzes ausgesalzen wird. Ist seine Löslichkeit vor dem Elektrolytzusatz S_0 und nach dem Zusatz S , so gilt

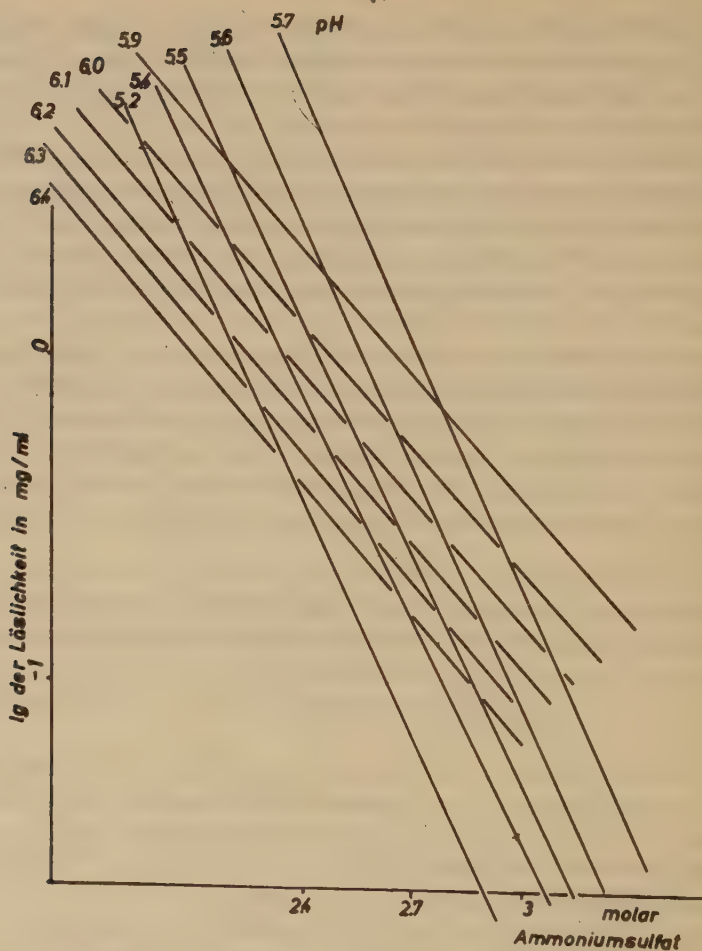
$$S/S_0 = 1/f \quad \text{oder} \quad \ln S = \ln S_0 - \ln f \quad 22$$

wonach unter Benutzung von (2) das Grenzesetz für die Neutralsalzwirkung folgt. Der Wert der Aussalzkonstante ergibt sich demnach zu

$$K = a \frac{e^2}{2 D o r k T} \int v_i z_i^2 \quad 23$$

Im numerischen Wert von K äußert sich demnach als Proteineigenschaft, in welchem Maße es die Dielektrizitätskonstante der gemeinsamen Lösung von Salz und Wasser beeinflusst. Man darf wohl folgern, daß dabei die Dielektrizitätskonstante des Proteins (immer bei hoher Ionenstärke betrachtet), entscheidend ist.

Durch Messung der pH-Abhängigkeit der Proteinlöslichkeit bei verschiedenen Ionenstärken sollte man daher Aussagen über den pH-Gang der Dielektrizitätskonstanten des Proteins unter den Lösungsbedingungen machen können. In Abbildung 30 ist die Löslichkeit der Enolase gemäß Cohns Ansatz bei verschiedenen pH-Werten aufgetragen. Die Werte wurden den in Abbildung 28 beschriebenen Messungen entnommen. Wir erkennen, daß die K -Werte beiderseits des Löslichkeitsgipfels voneinander verschieden sind, daß sie aber auf jeweils einer Seite des Gipfels konstant bleiben, während sich dort die Löslichkeit um Größenordnungen ändert.



Die Abhängigkeit der Löslichkeit der Enolase von der Ammoniumsulfatkonzentration in der Auftragung nach Cohn bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen. Die Werte wurden der Ausgleichskurve der Abbildung 7 entnommen (aus den beiden unteren Kurven nachdem sie horizontal so verschoben worden waren, daß die Maxima auf den gleichen pH-Wert, 5,8, fielen).

Tabelle der K- und B-Werte für Enolase und Laktatdehydrogenase bei verschiedenen pH-Werten.

(Die Zahlen für die Laktatdehydrogenase wurden den in Abbildung 29 beschriebenen Versuchen entnommen.)

Enolase

$B_{\max}$ des "sauren" Kurvenastes 7,1

$B_{\max}$ des "alkalischen" Kurvenastes 4,1

pH-pH _{max}	0,6	0,4	0,3	0,2	0,1	0	-0,1	-0,2	-0,3	-0,4	-0,5	-0,6
K	2,4	2,3	2,3	2,4	2,5	-	1,2	1,2	1,3	1,3	1,3	1,3
$B_{\max}-B$	1,4	1,0	0,9	0,6	0,3	0	0,3	0,5	0,7	0,9	0,9	1,0

Laktatdehydrogenase

$B_{\max} = 3,6$

pH	5,2	5,6	6,0	6,4	6,8
K	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4
$B_{\max}-B$	0,5	0,2	0	0,03	0,1

Dem folgt als Aussage: pH-abhängige Änderungen der Dielektrizitätskonstante sind nicht für die Löslichkeitsänderungen in einem Kurvenast verantwortlich, wohl aber haben sie mit dem Auftreten eines Knickpunktes im pH-abhängigen Gang der Löslichkeit zu tun.

Der Löslichkeitsanstieg dagegen lässt sich durch eine Änderung von B beschreiben, wie es A.A. Green 1931 für das CO-Pferdehämooglobin getan hat (7). B ist bei gegebenem pH-Wert und gegebenem Neutralsalzmilieu eine Stoffkonstante eines Proteins, in der sich sein Zustand in Sediment und Überstand äußert. Dieser Zustand ist also von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig.

Phasenregel und Löslichkeit der Enolase.

Den Löslichkeitsgipfel in dem pH-Gang der Löslichkeit der Enolase kann man als Punkt einer Unstetigkeit in der Löslichkeitskurve auch als Tripelpunkt im Sinne der Phasenregel deuten, denn die Fällungsformen des Proteins sind zu beiden Seiten des Knickpunktes in einigen physikalischen Eigenschaften verschieden.

1. Unterschiede im Kristallbild.

Bei der Aussalzung einer Enolaselösung auf der alkalischen Seite des Löslichkeitsgipfels fallen Nadeln aus, die mit der Zeit zu schmalen Tafeln heranwachsen, die maximal 0,1 mm lang werden. Sie sind in Abbildung 9c vorgestellt. In der Röntgenanalys in der Debye- und Scherreranordnung geben sie die für einen Proteinkristall typischen Reflexe.

Auf der sauren Seite des Löslichkeitsgipfels fällt ein sehr feines Präparat von nadeligem Habitus aus. Es ist aber lichtmikroskopisch nicht klar deutbar, da nur die Längsdimensionen der Fällungen die Auflösungsgrenze des Lichtmikroskopes überschreiten. Abbildung 9b zeigt diese Fällungsform der Enolase [bei pH 5,3 erhalten] in elektronenmikroskopischer Vergrößerung.

Nach Aussage dieser Bilder stehen echten Kristallen auf der alkalischen Seite Fällungen auf der sauren Seite gegenüber, die nicht vollständig die Kriterien eines Kristalls, unendliche periodische und dreidimensionale Anordnung der Gitterbausteine erfüllen. Der Ausfall von Impfversuchen, nach denen die beiden Formen wechselseitig als Kristallisationskeime versagten, stützt diese Deutung.

2. Unterschiede in den Löslichkeitskonstanten.

Wie Abbildung 30 zeigt, sind die R- und K-Werte aus Cohns Gleichung für beide Fällungsformen der Enolase verschieden. Sie sind in einer Tabelle auf Seite 74 zusammengestellt. Damit ist, die Anwendbarkeit der Überlegungen von Debye und Aulay auf Proteine im Aussalzbereich vorausgesetzt, erwiesen, daß die Dielektrizitätskonstanten der beiden Fällungsformen verschieden sind. Aus der Verschiedenheit der K-Werte ist auf weitere Unterschiede in den intermolekularen Energiebeziehungen zu schließen.

Wir stehen hier vor der Tatsache, daß sich in dem pH-Bereich eines Kurvenastes die chemische Zusammensetzung des Bodenkörpers mit der Wasserstoffionenkonzentration ändert, daß er aber doch als über einen gewissen pH-Bereich einheitliche Phase auftritt - eine Folge aus dem smeared site-Modell von Linderström-Lang.

Isoelektrischer Punkt und Löslichkeit der Enolase.

Die frühen Arbeiten über die pH-Abhängigkeit der Proteinlöslichkeit an Hämoglobin, Eialbumin, Kasein und β -Laktoglobulin ergaben Löslichkeitsminima zwischen pH 6 und 7, wo auch die isoelektrischen Punkte dieser Proteine gefunden wurden. Das ist in verallgemeinerter Formulierung in das Lehrbuchwissen eingegangen.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Proteine zeigen teilweise einen pH-Gang der Löslichkeit, in dem gar kein Löslichkeitsminimum vorkommt. Eher scheinen Plateaus geringer Löslichkeit typisch zu sein, die durch Löslichkeitsgipfel von einander getrennt sind. Die Frage nach einer auch für diese Proteine mit neuen Löslichkeitseigenschaften geltenden Beziehungen ist naheliegend. Ihre Beantwortung ist aber schwierig, da der isoelektrische Punkt nur zusammen mit einer speziellen Messvorschrift, die Ionenstärke und Ionenmilieu vorschreibt, definiert ist. Auf Seite 50 wurde z.B. erwähnt, daß der isoelektrische Punkt der Glyceraldehydphosphatdehydrogenase um 1,3 pH-Einheiten nach niederen Wasserstoffionenkonzentrationen wandert, wenn man die Ionenstärke im Messmedium um 0,2 erhöht. Weiter ging aus eigenen Messungen der Titrationskurve des Histidins bei niederen bis höchsten Neutralsalzkonzentrationen hervor, daß der pK_2 -Wert des Histidins um bis zu 2 pH-Einheiten durch Erhöhen der Salzkonzentration in den alkalischen Bereich verschoben werden kann.

Da nun der isoelektrische Punkt der Proteine nicht bei Ionenstärken über 0,3 gemessen werden kann, während die Messung der Löslichkeitskurven im saltin out-Bereich Ionenstärken um 6 erfordert, so dürfte die früh erkannte Beziehung zwischen isoelektrischem Punkt und Löslichkeitsminimum zufälliger Art gewesen sein. Solange nicht der isoelektrische Punkt der Proteine auch unter den Bedingungen des salting-out bekannt ist, dürften Überlegungen über seine Beziehung zur Löslichkeitskurve spekulativen Charakter tragen. Sie werden hier nicht versucht.

Formänderungen und Löslichkeit der Enolase.

Formänderungen im Proteinmolekül, wie sie von Perutz [58] für das Hämoglobin bei Sauerstoffaufnahme gezeigt wurden, könnten auch auftreten, wenn mit der Wasserstoffionenkonzentration Ladungssumme und Überschussladung sich ändern. Von hier aus wären Löslichkeitsänderungen zu erwarten.

Mit zwei Methoden, der Gelfiltration und der Viskositätsmessung, wurde nach solchen pH-abhängigen Formänderungen bei der Enolase gesucht. Beide Methoden erlauben Volumenunterschiede von etwa 10 % zu erkennen. Wie Abbildung 31 ausweist, war mit der Gelfiltrationstechnik weder bei der Enolase noch bei den zum Vergleich mitgeprüften Proteinen eine pH-induzierte Formänderung nachzuweisen, auch die spezifische Viskosität war nicht pH-abhängig. Desgleichen konnte bei der Enolase und 4 weiteren Enzymproteinen kein Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf die spezifische optische Aktivität gezeigt werden.

Da aber auch geringere Formänderungen, als sie von den oben erwähnten Techniken sichtbar gemacht werden können, in ihrer Auswirkung auf die intermolekularen Energiebeziehungen zu Löslichkeitsänderungen führen könnten, bleibt die Frage nach Formänderungen als Ursache von Löslichkeitsänderungen offen.

Zusammenfassung der Diskussion.

Die Theorien von Green und Linderstrøm-Lang haben sich nicht als geeignet erwiesen, den pH-Gang der Löslichkeit der Enolase und wohl auch der ihr im Löslichkeitsverhalten verwandten Proteine zu beschreiben, da zwei Experimente, die Titration im festen Zustand und die Messung der Löslichkeitskonstanten in verschiedenem Ionenmilieu nicht mit ihren Postulaten zu vereinbaren sind.

Die Theorie der Aussalzung von Debye und Aulay, an der Löslichkeit von Alkoholen und Kohlenhydraten entwickelt, führt zur Vorhersage der Unabhängigkeit der Dielektrizitätskonstante der Proteine von der Wasserstoffionenkonzentration. So ist auch von hier aus der Zugang zum Verständnis der pH-Abhängigkeit der Proteinlöslichkeit verschlossen.

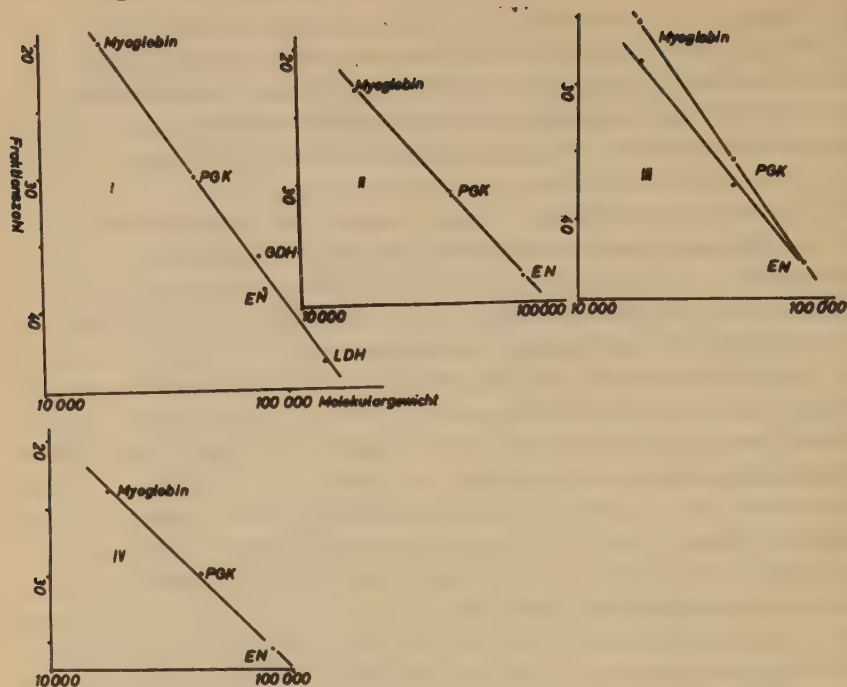
Nach meiner Meinung sollte sich daher das Interesse auf den Zusammenhang zwischen der pH-Abhängigkeit der Hydratation von Proteinen und ihrer Löslichkeit konzentrieren. Je größer die zunächst nicht erklärte "Hydratationskraft" eines Proteins ist, desto mehr wird es sich der aussalzenden Kraft des Neutral-salzes widersetzen und desto größer wird seine Löslichkeit im salting-out-Bereich sein.

Hydratation von Proteinen ist aber an die Zahl der polarisierenden Gruppen im Proteinmolekül gebunden und wird der Ladungssumme aus positiven und negativen Ladungen in etwa parallel gehen. Sie und damit die Löslichkeit sollten in mittleren pH-Bereichen ein Maximum durchlaufen.

Den Bereich maximaler Ladungssumme kann man aber aus den pK-Werten der prototropen Gruppen in Proteinen in etwa abschätzen. Nach Cohn und Edsall [60] liegen die pK-Werte der Asparaginsäure in Proteinen um 3,0 bis 4,7 , die der Glutaminsäure um 4,4. Nun klafft eine Lücke bis zur nächstschwächeren Säure, dem Histidiniumkation mit einem pK-Wert zwischen pK 5,6 und 7,0. Dazwischen muss der Punkt maximaler Ladungssumme liegen, und er sollte sich mit wachsender Ionenstärke nach höheren pH-Werten verschieben. Wie bereits erwähnt, verschiebt sich auch das Löslichkeitsmaximum der Enolase mit steigender Ammoniumsulfatkonzentration zu höheren pH-Werten. Die Vorstellung macht plausibel, daß zahlreiche Proteine um pH-6 herum einen Löslichkeitsgipfel aufweisen.

Von einem Verständnis des Löslichkeitsmaximums, das gleichzeitig auch eine Erklärung des logarithmischen Anstiegs der Löslichkeit in den einzelnen Kurvenästen enthalten sollte, ist diese Betrachtungsweise noch weit entfernt.

Abbildung 31

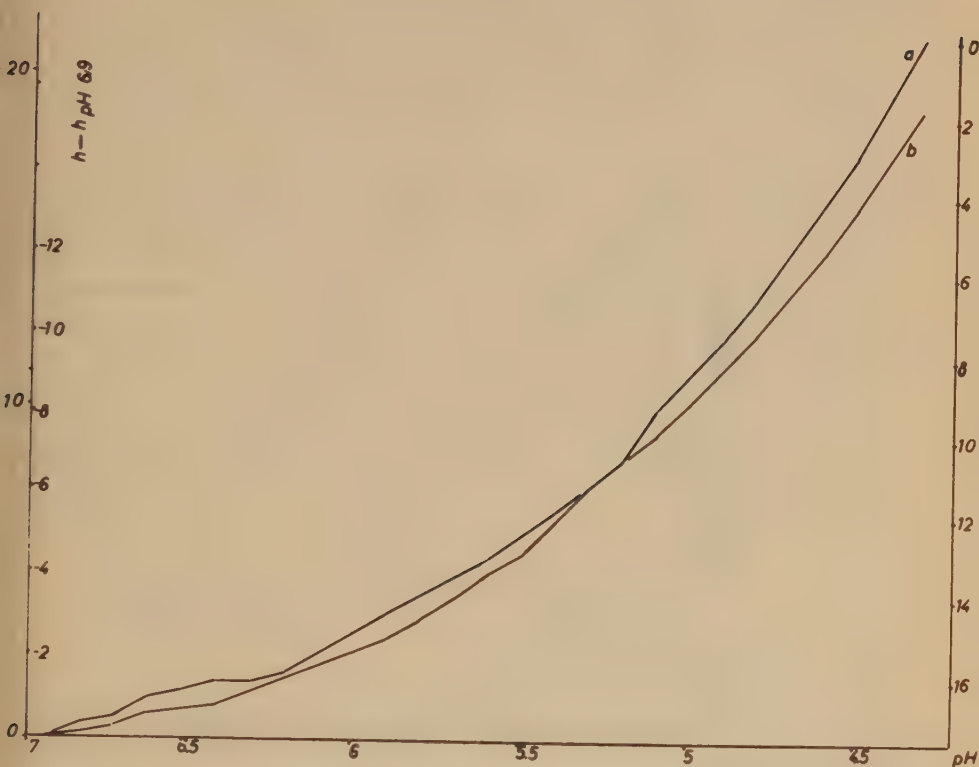


Molekulargewichtsbestimmung an der Enolase nach der Gelfiltrationstechnik mit Sephadex G 200.

In der Abszisse das Molekulargewicht in logarithmischer Auftragung, in der Ordinate die Fraktionsnummer, die ohne Einfluss auf die Ergebnisse ist, sondern nur die Steilheit der Leitlinie festlegt. Als Vergleichsproteine wurden eingesetzt: Myoglobin (MG 17 800), Phosphoglyceratkinase (MG 42 500), Glycerophosphatdehydrogenase (MG 78 000) und Laktatdehydrogenase (MG 144 000), das erste aus Pottwal, die Enzyme aus Kaninchenmuskel.

Kurve 1 bei pH 7,0 in 0,05 molar Ammoniumsulfat, Kurve 2 in bei pH 7,0 in 0,55 molar Ammoniumsulfat, Kurve 3 (zwei Versuche) bei pH 7,0 in 2,20 molar Ammoniumsulfat und Kurve 4 bei pH 5,20 in 2,20 molar Ammoniumsulfat. Resultierendes Molegewicht der Enolase bei allen pH-Werten und Ionenstärken um 82 000 in Übereinstimmung mit den Literaturangaben für das aus zwei Untereinheiten bestehende Enzym.

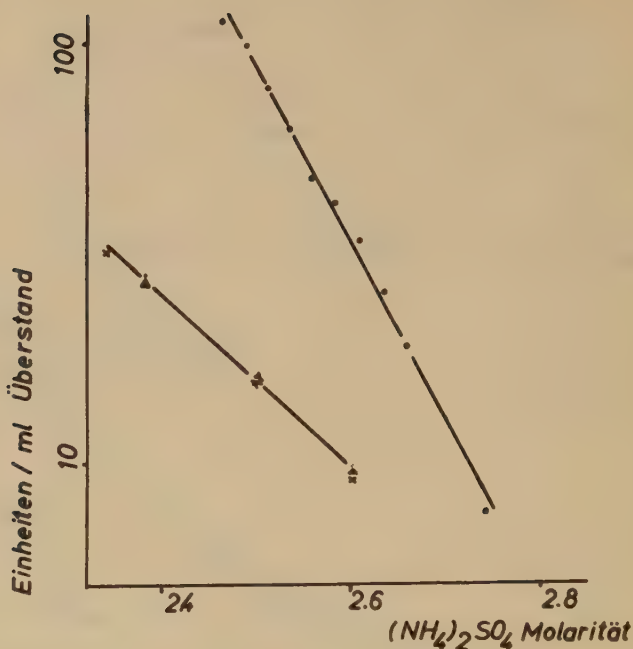
Abbildung 32



Die Titration der Enolase bei hohen Ionenstärken.
 Vorgelegt 2 Milliliter Proteinlösung oder Suspension mit
 67,2 Milligramm Protein pro Milliliter = 0,82 Mikromol.
 Titration mit 1 n- H_2SO_4 . Kurve a in 3,79 molar Ammonium-
 sulfat, Enolase als Suspension. Kurve b in 1,42 molar
 Ammoniumsulfat, Enolase gelöst. Die Zahl h bedeutet die
 Zahl der pro Proteinmolekül aufgenommenen Protonen, von
 einem frei gewählten pH-Wert aus gerechnet. Der Säurever-
 brauch durch das gleichzeitig puffernde Ammoniumsulfat
 ist bereits abgezogen.

Abbildung

33



Konstanz der Parameter aus Cohns Gleichung im pH-Bereich der Minimalplateaus.

Obere Kurve bei pH 5,3, die unteren Kurven bei pH 6,6 [Punkte] 7,0 [Kreuze] und 7,7 [Dreiecke] aufgenommen.

Der pH-Gang der Proteinlöslichkeit als Reinheitskriterium. Nicht denaturiertes Fremdprotein ist in einem kristallinen Enzympräparat durch die vorhergegangenen Reinigungsschritte nur in geringer Konzentration vorhanden, hat aber eine ähnliche Löslichkeit wie das Hauptprodukt. Sieht man von einem möglichen isomorphen Einbau in dessen Kristallgitter ab, so sollte seine Löslichkeitskonzentration auch dann noch nicht erreicht sein, wenn die Hauptkomponente schon weitgehend im Sediment vorliegt. Die Verunreinigungen werden sich also im Überstand anreichern.

Dann misst die Aktivitätskurve der Hauptkomponente die Löslichkeit des Reinenzyms, die Proteinkurve aber das reine Enzym in sei-

ner wechselnden und die Verunreinigungen in konstanter Konzentration im Überstand. Die Proteinkurve eines nicht ganz reinen Präparats wird also stets flacher sein als die Aktivitätskurve. Durch Abziehen eines konstanten Faktors - eben des Fremdproteins - kann man die Steigung der Proteinkurve an die der Aktivitätskurve angleichen. Dieser Faktor ist dann direkt die Konzentration des Fremdproteins im Überstand.

Trägt man also die Differenz der Löslichkeit und der Löslichkeit im Minimalplateau der Löslichkeit für ein Protein in logarithmischem Maßstab gegen den pH-Wert auf, so erhält man Gerade gleicher Steigung, wenn man einmal die Aktivität und das andere Mal die Proteinkonzentration im Überstand als Maß der Löslichkeit nimmt.

Die Parallelität beweist, daß das eventuell anwesende Fremdprotein im Rahmen der Meßgenauigkeit in allen Proben in gleicher Konzentration im Überstand vorliegt, wie es theoretisch zu erwarten ist.

Es wird bei der Differenzenbildung als konstanter Faktor abgezogen und tritt nicht mehr in der Kurve in Erscheinung.

Ist das so, so kann man einen Quotienten bilden, der von anwesendem Fremdprotein unabhängig ist:

$$\frac{E_1 - E_2}{S_1 - S_2} \quad \begin{array}{l} E = \text{Aktivität,} \\ S = \text{Proteinkonzentration,} \\ \text{beide im Überstand bei den pH-Werten 1 und 2.} \end{array}$$

Der Quotient hat den numerischen Wert der spezifischen Aktivität des Reinproteins. Für die Trioseisomerase erhält man nach dieser Überlegung:

$$\frac{E_{\text{pH } 6,0} - E_{\text{pH } 5,6}}{S_{\text{pH } 6,0} - S_{\text{pH } 5,6}} = \frac{23\ 600}{2,75} = 8\ 600$$

die spezifische Aktivität der reinen Trioseisomerase in internationalen Einheiten pro mg Protein.

Die Methode versagt natürlich in den Fällen, wo die Verunreinigung durch Eigenprotein verursacht ist, das zwar noch löslich ist und die gleichen Kristallisationseigenschaften besitzt wie das native Protein, aber in seiner enzymatischen Aktivität verändert ist. In der Aldolase und der Glyceraldehydphosphatdehydrogenase wurden hier solche Enzyme vorgestellt.

Die spezifische Aktivität der anderen hier beschriebenen Enzyme wurde nach dem hier angewandten Reinheitskriterium geprüft und keine Verunreinigung an Fremdprotein festgestellt.

MATERIAL UND METHODEN.

Die Glykolyseenzyme aus Kaninchenmuskel wurden durch Fällungsschritte nach (1) und (2) gewonnen. Sie waren kristallin und wurden vor den Versuchen noch einmal umkristallisiert. Eine Reihe von ihnen, Glyceraldehydphosphatdehydrogenase, Enolase und Laktatdehydrogenase, weisen die höchsten bisher beschriebenen spezifischen Aktivitäten auf.

Das Pottwalmyoglobin lieferte die Firma Seravac (Moneyrow Green, Maidenhead, Berks. England). Es ist chromatografisch nach Kendrew und Parrish(61) gereinigt, einmal kristallisiert und lyophilisiert. Es enthält etwa 1 % Fremdprotein. Es wurde vor dem Einsatz in die Löslichkeitsmessungen noch einmal umkristallisiert.

Die Malatdehydrogenase aus Pferdeherz wurde von der Firma Boehringer (Biochemische Abteilung, Tutzing, Obb.) geliefert. Es war ein amorphes Präparat und wurde über drei Fällungsschritte mit Ammoniumsulfat bei pH 6,0 fraktioniert und im letzten Schritt kristallisiert.

Bei den vorbereitenden präparativen Arbeiten zeigte sich, daß die saubersten Proteinkristallisate erhalten wurden, wenn die Ionenstärke der Proteinklösung durch Einpumpen gesättigter Ammonsulfatlösung vom gewollten pH-Wert erhöht wurde. Zugabe von festem Ammonsulfat oder Dialyse gegen gesättigte Ammonsulfatlösung gab minder saubere Fällungen. Das Ammoniumsulfat war von p.a.-Qualität und wurde zuvor noch einmal unter Zusatz von zwei Gramm Äthylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz und einem Milliliter NH_3 konz. pro Liter heisser Lösung umkristallisiert.

Die Testsubstrate und Hilfsenzyme waren Handelspräparate der Firmen Boehringer und California Corp. Glyceraldehydphosphat zur Bestimmung der Trioseisomerase wurde durch Hydrolyse des Diacetals nach (62) hergestellt.

Die Enzymaktivitäten wurden im optischen Test nach Warburg (63) bei $25 \pm 0,7$ Grad C über die DPNH-Konzentration bestimmt. Die automatische Aufzeichnung der Extinction erlaubte eine Auswertung auf ± 5 % Fehler. Die Testzusammenstzungen folgten den Angaben von H. U. Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, 1962 .

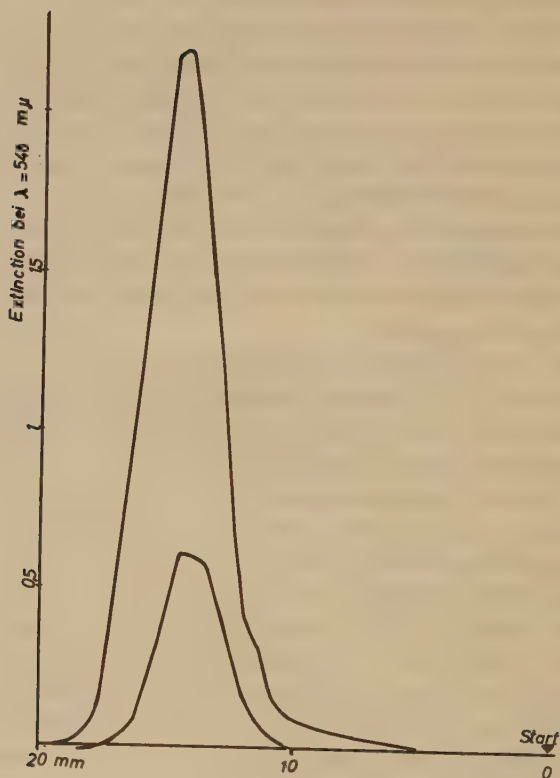
Der Enolasetest gab schlecht reproduzierbare Werte. Darum wurde die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität der Enolase von der Wasserstoffionenkonzentration kontrolliert. (über die Extinction bei einer Wellenlänge von 240 $m\mu$ des Phosphoenolpyruvats). Das Ergebnis ist in Abbildung 10 dargestellt. Es zeigt, daß beim angegebenen Test-pH-Wert von 7,6 die Empfindlichkeit der Bestimmung gering war und ihre Anfälligkeit gegen Schwankungen in der Wasserstoffionenkonzentration groß. Darum wurde als neue Puffersubstanz das Imidazol gewählt, das dem pH-Wert optimaler enzymatischer Aktivität besser angepasst ist. Der Test wurde dann - mit Rücksicht auf die pH-Optima der Hilfsenzyme an der Schulter der pH-Aktivitätskurve der Enolase bei pH 6,9 ausgeführt.

Die Proteinkonzentration wurde nach der von Bücher und Mitarbeitern (1) beschriebenen Variante der Biuretmethode gemessen. Als Umrechnungsfaktor zwischen Extinction und Proteinkonzentration wurde einheitlich der Wert 17,5 zugrunde gelegt. Da die realen Umrechnungsfaktoren für individuelle Proteine Schwankungen unterworfen sind, sind die Proteinkonzentrationsangaben vorwiegend zum Vergleich innerhalb einer Messreihe gedacht. Es gelang nicht, die Proteinkonzentration in angenähert gesättigten Proteinlösungen über die proteineigene Extinction bei 280 $m\mu$ zu messen, weil das Protein aus gesättigter Lösung beim Umgießen teilweise ausfällt. Die Erscheinung ist regelmäßig beim Pipettieren angenäher gesättigter Proteinlösungen zu beobachten und kann, wie gemessen wurde, einige μ der Proteinmenge in der Pipette zurückhalten. Das Eiweiß fällt in Lappen aus, die für das unbewaffnete Auge sichtbar sind, es bleibt wasserlöslich und enzymatisch aktiv.

Die Messung der Löslichkeitskurven.

Die Messung der pH-Abhängigkeit der Löslichkeit von Proteinen ist heikel. Die größten Fehlerquellen sind wahrscheinlich Änderungen in der Salzkonzentration der Lösungen während der Gleichgewichtseinstellung durch Verdunsten von Wasser, das auch Polyäthylenverschlüsse durchdringt, und durch Verluste von NH_3 mit Folgen für den pH-Wert der kaum gepufferten Lösungen.

Abbildung 34



Agargelphorogramm der für die vorliegende Arbeit verwendeten Enolasepräparation.

In der Abszisse ist die Wanderstrecke in Millimetern angegeben, in der Ordinate die Extinction bei $548 \text{ m}\mu$ nach Anfärbung mit Amidoschwarz 10 B. Die beiden abgebildeten Kurven repräsentieren verschiedene Proteinkonzentrationen. Die disk-Elektrophorese ergab ein prinzipiell ähnliches Bild.

Aber auch die Proteine erschweren genaue Messungen durch ihre Instabilität bei bestimmten pH-Werten und die langsame Einstellung des Lösungsgleichgewichts.

Zur Messung wurden etwa 15 ml einer Proteidlösung mit 5 bis 15 Milligramm Protein pro Milliliter angesetzt mit der durch Vorversuche gefundenen günstigsten Ammoniumsulfatmolarität. Sie ist nach beiden Seiten begrenzt, einmal, weil im Löslichkeitsgipfel die Größe K_s der Cohnschen Beziehung noch konstant sein sollte - Cohns Gleichung ist ja ein Grenzgesetz für geringe Proteinklöslichkeit - andererseits sollte im Löslichkeitsminimum noch genügend Protein für die Bestimmung über die Biuretreaktion im Überstand bleiben. Die dadurch gezogenen Grenzen legten für die Trioseisomerase eine Beschränkung in dem bei einem Ansatz erfassbaren pH-Bereich auf. In diesem Fall wurde der weitere Verlauf der pH-abhängigen Löslichkeitskurve bei einer anderen Salzkonzentration gemessen.

Je ein Milliliter der Proteinsuspension wurde nun in ein Probegläschen gefüllt und dieses sofort verschlossen. Dann wurden die Gläschen mit etwa 1 n- H_2SO_4 zur sauren und mit etwa 4 n- NH_3 zur alkalischen Seite auf die gewünschten pH-Werte eingestellt. Diese Lösungen enthielten Ammoniumsulfat in der gleichen Konzentration wie die vorgelegte Suspension.

Ammoniumsulfat in den eingesetzten Konzentrationen ist ein wirksamer Puffer unterhalb von pH 4 und oberhalb von pH 8. Das mag einmal eine notwendige Voraussetzung dafür sein, daß mit den angegebenen Säuren und -augen titriert werden durfte, ohne daß Proteindenaturierungen zu beobachten waren. Es begrenzt aber zugleich den der Messung zugänglichen pH-Bereich. Oberhalb von pH 8 wurde daher mit etwa 8 n- NH_3 titriert und etwa bei pH 8,5 ist eine Grenze erreicht, über die man den pH-Wert nicht mehr steigern kann, ohne die Bedingung konstanter Ionenkonzentration zu verletzen.

Die verschlossenen Proben wurden anschließend 48 Stunden im Eisbad über einen Intervallschalter in 5 % der Zeit gerührt (Magnetrührer).

Die Abtrennung des Sediments gelang ohne Umschütten, wobei das hohe spezifische Gewicht des flüssigen Tetrabromäthans ausgenützt wurde. Auf ihm schwimmen während der abschließenden Zentrifugation (6000 G und 60 Minuten) die

Probegläser. Bei den Löslichkeitsmessungen zum Myoglobin erfolgte die Gleichgewichtseinstellung gleich in den Küvetten, in denen auch im Schwimmen die Zentrifugation möglich ist.

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität im Überstand wurde ein Teil mit einer Mikropipette (Firma Netheler und Hinz, Hamburg Wellingsbüttel) abgehebert und mit Eiswasser passend verdünnt. Testmischungen wurden für einen Versuch im Ganzen angesetzt und in Eiswasser aufbewahrt. Anschließend wurde der Rest des Überstandes in Zentrifugengläser dekantiert, gewogen und über die Biuretreaktion die Proteinkonzentration bestimmt.

Zur pH-Messung diente eine Glaselektrode vom Typ Radiometer 220 c, als Gegenelektrode eine Kalomelelektrode mit einer Öse aus Polyäthylenschlauch als Salzbrücke.

Die Vielzahl der Fehlerquellen bei den hier beschriebenen Operationen führt leicht dazu, daß einzelne Messwerte einer pH-Reihe weit ausserhalb der von den Nachbarn vorgezeichneten Bahn liegen. Die Reproduzierbarkeit der pH-Löslichkeitskurven im Quantitativen ist nicht gut. Darum wurden von jedem Protein mehrere Kurven aufgenommen, und in dieser Arbeit wird der Ansatz wiedergegeben, durch dessen Punktfolge sich die einfachste Kurve ziehen ließ. Die Methode ist also eine Variante der Fehlerrechnung nach der Zentralwertmethode bei graphischer Auswertung. Sie wurde gewählt, weil nicht alle Messwerte mit der gleichen Fehlerwahrscheinlichkeit behaftet sind.

Alle Proteinlösungen, auch in den Ansätzen zur Löslichkeitsmessung, enthielten ein Milligramm Äthylendiamintetraacetat pro Milliliter Lösung. Es hat die doppelte Aufgabe, Schwermetallspuren zu binden und im Bereich seiner Dissoziationskonstanten $pK_3 = 6,16$ und $pK_4 = 10,26$ zu puffern.

Die Ammonsulfatkonzentration wurde in den ersten Ansätzen über das spezifische Gewicht, später über den Brechungsindex bestimmt. Dazu wurde in einem Aliquot zunächst unter Schutz gegen Verdunstungsverluste das Protein durch Nitzedenaturierung ausgefällt und mit 10 μ -Litern in einem Zeiss-Mikrorefraktometer der Brechungsindex bei 22 Grad bestimmt.

Die Messung der Titrationskurven.

Zur Messung der Titrationskurven wurden jeweils 2 ml Proteinsuspension oder Lösung im Titrierstand TTA 31 des Titrigraphen der Firma Radiometer (Kopenhagen) unter Stickstoffatmosphäre mit 1 n H_2SO_4 titriert. In die Auswertungen wurde die Differenz zwischen den so erhaltenen Volumina und den Ergebnissen aus einer proteinfreien Blindprobe eingesetzt.

Die Molekulargewichtsbestimmung.

Das Molekulargewicht wurde, wie Abbildung 31 ausweist, in 0,05 molar, 0,55 molar und 2,20 molar Ammoniumsulfat ausgeführt. Dabei wurde die allgemein übliche und zum Beispiel in [64] beschriebene Technik eingehalten. Die Säulenlänge betrug 70, ihr Durchmesser 1 cm. Vertikalgeschwindigkeit der wässrigen Phase 4 cm/Stunde, Raumtemperatur und Auswertung über die enzymatische Aktivität. Die Fraktionsgröße war etwa 1 ml.

Die Messung der optischen Aktivität.

Auf der Suche nach pH-abhängigen Proteineigenschaften wurde die optische Aktivität der Enzyme Aldolase, Glyceraldehydphosphatdehydrogenase, Enolase und Malatdehydrogenase gemessen. Das Protein wurde dazu gegen destilliertes Wasser dialysiert, lyophilisiert und zu einer Lösung von rund 50 Milligramm pro Milliliter in destilliertem Wasser angesetzt. Diese Konzentration gibt bei einer Wellenlänge von 589 m μ und 200 mm Schichtdicke eine Drehung von etwa 3 Grad. Die Proteine sind bei so hohen Konzentrationen und Schichtdicken leicht gelblich und trüben sich bei sauren pH-Werten ein, ehe der thermische Ausgleich im Polarimeterrohr abgeschlossen und damit Schlierenfreiheit erreicht ist. Der Mittlere Fehler des Mittelwertes der Messungen am "Zeiss Kreispolarimeter 0,01 Grad" lag bei 0,05 Grad. Innerhalb dieser Messgenauigkeit war die Drehung keines der geprüften Proteine pH-abhängig im nativen Bereich zwischen pH 5 und 7.

Die Messung der Viskosität.

Die Viskosität der Enolase wurde in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung gemessen. Dazu wurde ein vereinfachtes und verkleinertes Ostwaldviskosimeter zusammengestellt. In ein Probeglas von 5 Millilitern Volumen tauchte die Spitze einer Mikrobürette, eine Glaselektrode und die Spitze der Viskosimeterkapillare. Ferner enthielt das Glas den Rührkern zu einem Magnetrührer. So konnte abwechselnd titriert und die Viskosität gemessen werden.

Zusammenfassung.

In dieser Arbeit wird die pH-Abhängigkeit der Löslichkeit im Aussalzbereich folgender Proteine von Albumincharakter beschrieben: Aldolase, Glyceraldehydphosphatdehydrogenase, Phosphoglyceratkinase, Lactatdehydrogenase, Pyruvatkinase, Trioseisomerase - alle aus Kaninchenskelettmuskel - Malatdehydrogenase aus Pferdeherz und Pottwalmyoglobin in den Varianten CO-Myoglobin, Metmyoglobin und Zyanmetmyoglobin. Eine Zusammenfassung der beobachteten Löslichkeitskurven ist auf Seite 6 in Abbildung 1 wiedergegeben.

Das auffallendste Ergebnis dieser Messungen ist die Vielfalt der vorkommenden Kurventypen, die kaum allen gemeinsame Züge erkennen lassen. Bei allen Proteinen ändert sich die Löslichkeit in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration, bei den meisten ist diese Änderung in bestimmten pH-Bereichen eine exponentielle Funktion des pH-Wertes. Bei 6 der 10 untersuchten Proteine zeigt die Löslichkeitskurve einen Knickpunkt am pH-Wert maximaler Löslichkeit.

Auf der Suche nach Beziehungen zwischen dem pH-Gang der Löslichkeit und anderen pH-abhängigen Proteineigenschaften wurden an der Enolase als herausgegriffenem Beispiel folgende Eigenschaften gemessen: Enzymatische Aktivität, optische Aktivität, spezifische Pufferkapazität, spezifische Viskosität und Dispersionsgrad. Optische Aktivität, Viskosität und Dispersionsgrad erwiesen sich als unabhängig von der Wasserstoffionenkonzentration. Zwischen der pH-Funktion der übrigen Proteineigenschaften und dem pH-Gang der Löslichkeit ließ sich keine Beziehung erkennen.

Bei 5 der untersuchten Proteine erwies sich die Kristallform der entstehenden Niederschläge als pH-abhängig verschieden, und zwar scheint es, als gäbe es pH-Bereiche, in denen eine typische Abscheidungsform ausfällt, am Bereiche, in denen ohne Übergang eine andere Form ausfällt. Bei der Enolase und beim Zyanmetmyoglobin wurde wahrscheinlich gemacht, daß der Grenz-pH-Wert zwischen zwei Abscheidungsformen gleich dem Knick-pH-Wert der Löslichkeitskurve ist. Bei keinem der untersuchten Proteine kamen mehr als zwei Kristallformen vor, keines hatte mehr als ein Löslichkeitsmaximum.

Wieder am Beispiel der Enolase wurden die beiden Fällungsformen röntgenographisch, elektronenoptisch und durch

Impfversuche weiter charakterisiert. Dabei zeigte sich, daß auf der alkalischen Seite des Maximums der Löslichkeit normale Proteinkristalle vorliegen, auf der sauren aber eine Abscheidungsform entsteht, die nur einen Teil der Eigenschaften aufweist, durch die ein Kristall definiert ist.

Im experimentellen Teil wird eine Zentrifugationstechnik in schwimmenden Küvetten beschrieben.

Im theoretischen Teil werden die von Linderström-Lang und A.A. Green erarbeiteten Vorstellungen über die Ursachen der pH-Abhängigkeit der Proteinlöslichkeit auf ihre Anwendbarkeit auf das Löslichkeitsverhalten der Enolase geprüft. Dabei ergab sich, daß eine ihrer vereinfachenden Annahmen, daß das Protein im Sediment in pH-unabhängig protonierter Form vorliegt, nicht zulässig ist. Vielmehr stehen die prototropen Gruppen mit den gleichen pK-Werten mit dem Wasserstoffionen des Lösungsmittels im Gleichgewicht wie die des gelösten Proteins.

Weiter wird aus Betrachtungen über die ionicstärkeabhängige Wanderung des isoelektrischen Punktes heraus die Diskussion über einen Zusammenhang zwischen isoelektrischem Punkt und herausgehobenen Punkten der pH-abhängigen Löslichkeitskurve abgelehnt.

Der Versuch, von der Ähnlichkeit des pH-Ganges der Löslichkeit und der Abhängigkeit der Proteinlöslichkeit von der Neutralsalzkonzentration her zu einem Verständnis ersterer zu kommen, führte zur Modifikation der Theorie der Aussalzung von Debye und Aulay. Aber die experimentelle Prüfung ergab, daß die zu fordernde pH-Abhängigkeit der Dielektrizitätskonstante der Proteine nicht gegeben ist.

So bleiben nur Vermutungen über die Ursachen der pH-Abhängigkeit der Proteinlöslichkeit übrig. Insbesondere dürfte die Hydratation des Proteinmoleküls von seiner Ladungssumme abhängen und da ein Maximum erreichen, wo die Ladungssumme ein Maximum aufweist. Hier sollte sich auch ein Punkt maximaler Löslichkeit bei den Neutralsalzkonzentrationen des Aussalzbereichs finden.

Ich danke meinem verehrten Lehrer, Prof. Dr. Dr. hc. Th. Bücher für die Überlassung des Themas und sein Interesse am Fortgang der Arbeit. Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Kuhn und Prof. Dr. G.M. Schwab für wertvolle Diskussionen und Prof.

Dr. W. Vogell sowie Prof. Dr. W. Hoppe für ihre Hilfe bei der Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen und der Röntgendiagramme.

Verzeichnis der benutzten Literatur.

1. Beisenherz, G., H. Boltze, Th. Bücher, R. Czock, K.H. Garbade, E. Meyer-Arendt und G. Pfeleiderer
Z. Naturforschg. 8b 555 [1953]
2. Czock, R. und Th. Bücher Adv. Prot. Chem. 15 315 [1960]
3. Setschenow, Ann. Chim. et Phys. 25 226 [1892]
4. Debye, P. Physik. Z. 24 185 [1923]
5. Debye, P. Ztschr. physikal. Chem. 130 56 [1927]
6. Debye, P. und J. Mc. Aulay Phys. Z. 26 22 [1925]
7. Green, A.A. J. biol. Chem. 93 517 [1931]
8. Distèche, A. Biochem. et biophys. Acta 61 265 [1948]
9. Winstead, J.A. und F. Wold Fed. Proc. 23 264 [1964]
10. Winstead, J.A. und F. Wold Biochemistry 3 791 [1964]
11. Winstead, J.A. und F. Wold Biochemistry 4 2145 [1965]
12. Winstead, J.A. und F. Wold Biochemical Preparations 11
31 [1966] sowie Holt, A. und F. Wold J. Biol. Chem.
236 3227 [1961]
13. Wold, F. und G. J. Ballou J. Biol. Chem. 227 313 [1957]
14. Edsall, J.T. in "Proteins, Aminoacids and Peptides" von E.J.
Cohn und J.T. Edsall bei Reinhold, New York
Seite 576
15. Kendrew, J.G. Nature 185 422 [1960]
16. Kendrew, J.G. Nature 190 666 [1961]
17. Kendrew, J.G. Nature 181 662 [1958]
18. Kendrew, J.G. Brookhaven Sym. Biol. 216 [1962]
19. Baranowski, T., Z. Physiol. Chem. 260 43 [1939]
20. Taylor, J.F. und C. Lowry Biochim. et biophys. Acta
20 109 [1956]
21. Taylor, J.F., A.A. Green und G.T. Cori J. Biol. Chem.
173 591 [1948]
22. Velik, S.F., J. Phys. Colloid Chem. 53 135 [1949]
23. Biochemica Boehringer Information Nov. 1961
24. Stellwagen, E. und H.K. Schachtmann, Biochemistry 1
302 [1962]
25. Christen, P.H., F. Leuthardt und A. Schmidt
Helv. Chim. Acta 48 1547 [1965]
26. Tanford, C. und L. G. Bunville J. Am. Chem. Soc.
81 4032 [1959]

27. Kornberg, A. und W.E. Pricer jr. J. biol. Chem.
193 481 [1951]
28. Tietz, A. und S. Ochoa Arch. Biochem. Biophys.
78 477 [1958]
29. Bücher, Th. und G. Pfeleiderer in S.O. Colowick und N.O.
Kaplan " Methods in Enzymology" 1 435 [1955]
Acad. Press New York
30. Warner, R.C., Arch. Biochim. Biophys. 78 494 [1958]
31. Reithel, F.P. in "Advances in Protein Chemistry" 18 165 [1963]
32. Morawiecki, A. Arch. Immunol. Therap. Doswiadczalnej
8 243 [1960] ref. in C.A. 55 1715 g [1961]
33. Dixon, M. und E.G. Webb in "Enzymes" bei Langmans 455 [1964]
34. Biochemica Boehringer Information Pyruvatkinase Nov. 1961
35. W. Krietsch unveröffentlicht
36. Morawiecki, A. Acta Biochim. Polon. 5 437 [1958]
37. Northrop, J.H. Ergebn. Enzymforsch. 1 302 [1932]
38. Wieland, Th., P. Duesberg und H. Determann
Biochem. Z. 337 302 [1963]
39. Pfeleiderer, G. und D. Deckel Biochem. Z. 329 370 [1957]
40. Dawson, D.M.G., T.L. Goodfriend und N.O. Kaplan
Science 143 929 [1964]
41. Baranowski T. Z. Physiol. Chem. 260 43 [1939]
42. Elias, H.G., A. Garbe und W. Lamprecht Z. Physio.
Chem. 319 22 [1960]
43. Dixon, M. und E.G. Webb in "Enzymes" bei Langmans London
454 [1964]
44. Harrington, W.F. und G.M. Karr J. Mol. Biol. 13
885 [1965]
45. Cori, G.T., M.W. Slein und C.F. Cori J. Biol. Chem.
159 565 [1945] und 173 605 [1948]
46. Biochemica Boehringer Information Malatdehydrogenase
November 1961
47. Kalan, E.B., R. Greenberg, M. Walter und W.G. Gordon
Biochem. Biophys. Res. Comm. 16 199 [1964]

48. Linderstrøm-Lang, K. und S.O. Nielsen in "Elektrophoresis" bei Acad. Press Seite 35 [1959]
49. Linderstrøm-Lang, K. Arch. Biochem. 11 191 [1946]
50. Grönvall, A. Compt. rend. lab. Carlsberg, Ser. chem. 24 185 [1942]
51. Ogston, A.G. und M.P. Thombs. Nature 178 200 [1956]
52. Ogston, A.G. Biochem. J. 59 644 [1955]
53. Michaelis, L. "Die Wasserstoffionenkonzentration" Berlin [1922]
54. Sano, R. Biochem. Z. 168 15 [1926]
55. Cohn, E.J. Physiol. Revs. 5 349 [1925]
56. Blake, C.G.F., D.F. Koenig, G.A. Mair, A.C.T. North, D.C. Phillips und V.R. Sarma. Nature 206 757 [1965]
57. Johnson, L.N. und D.C. Phillips Nature 206 761 [1965]
58. Perutz, M.F. , A.M. Liquori und F. Eivind Nature 167 929 [1951]
59. Perutz, M.F. Naturwiss. Rundsch. 19 261 [1966]
60. Cohn, E.J. und J.T. Edsall in "Proteins, Aminoacids and Peptides" bei Reinhold, New York.
61. Kendrew, J.G. und R.G. Parrish, Proc. R. Soc. London A 238 305 [1956]
62. Vorschrift der Firma Boehringer und Soehne, Mannheim
63. Warburg, O. Ergebn. Enzymforschung 7 210 [1938]
64. Ferdinando, A und C.B. Bruni Biochem. Z. 340 321 [1964]

Lebenslauf

Ich wurde am 8. Juli 1934 als Sohn des Kinderarztes Dr. Felix Sauer und seiner Frau Hella, geb. Nie, in Essen geboren. Hier besuchte ich auch von April 1940 bis Januar 1943 die Volksschule. Mein weiterer Schulbesuch wurde durch die Kriegsereignisse mehrfach unterbrochen, ich besuchte noch die Volksschulen in Gerolstein und Prüm (Eifel), dann kam der Schulbetrieb voll zum Erliegen.

1945 trat ich in die Sexta des staatlichen Neusprachlichen Gymnasiums in Betzdorf (Sieg) ein, wo ich in April 1954 die Reifeprüfung ablegte. Von 1954 bis 1959 studierte ich im Marburg (Lahn) Chemie und bestand im Juni 1959 die Diplomchemikerhauptprüfung.

Anschließend arbeitete ich ein Jahr als Stipendiat der französischen Regierung am anorganisch-chemischen Institut der Universität von Paris (Direktor Prof. André Chretien).

Ich kehrte nach Marburg zurück, wo ich in das physiologisch-chemische Institut der Universität eintrat. Ich fertigte dort unter Prof. Dr. Dr. Th. Bücher eine Diplomarbeit (bis April 1962) und anschließend eine Dissertation an.

Im April 1964 folgte ich Prof. Bücher an das physiologisch-chemische Institut der Universität in München.

Ich habe dort inzwischen eine Aufgabe im Labor für Elektronenmikroskopie übernommen.

